UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON GLYCOSYLIERTEN HÄMOGLOBINEN

DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN KURZFRISTIGEN BLUTZUCKERSCHWANKUNGEN UND REVERSIBLER ALDIMINFRAKTION

Christian Kolmar

Diss
München
1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534917_0015

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. N. Zöllner

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON GLYCOSYLIERTEN HÄMOGLOBINEN. DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN KURZFRISTIGEN BLUTZUCKERSCHWANKUNGEN UND REVERSIBLER ALDIMINFRAKTION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Mediz'n
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Kolmar
aus München

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. F. D. Goebel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.12.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. VERSUCHSBEDINGUNGEN

2.1. Versuchspersonen

2.2. Versuchsanordnung

2.3. Blutproben

2.4. Bestimmung der Parameter

2.4.1. Glukosebestimmung im Blut

2.4.2 Hämoglobin A_1 Bestimmung

3. ERGEBNISSE

3.1 Glukosewerte bei dem Injektionsversuch

3.2 Glukosewerte bei den Infusionsversuchen

3.3 Hämoglobin A_1

3.3.1 Reproduzierbarkeit der Methode

3.3.2 Aufstellung des Normalbereiches

3.3.3 Hämoglobin A_1 Werte bei dem Injektionsversuch

3.3.5 Hämoglobin A_1 Werte bei den Infusionsversuchen

4. DISKUSSION

4.1. Methodenvergleich

4.2. Hämoglobin A_1

4.2.1 In vitro Versuche

4.2.2 In vivo Versuche

4.3. Zusammenfassung

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Jahrhundertelang wurden in allen Kulturen die Symptome des Diabetes mellitus nur beschrieben, ohne daß eine Therapie möglich war. Erst seit der Isolierung des Insulins durch Banting und Mitarbeiter (4) im Jahre 1921 ist eine Therapie dieser bis dahin tödlich verlaufenden Krankheit erreicht worden.

Durch die darauffolgende Einführung von Insulinpräparaten (1923) wurden in der Behandlung des Diabetes mellitus wesentliche Fortschritte erzielt, die zu einer erheblichen Verlängerung der Lebenserwartung der Diabetiker führte.

Im Bemühen, eine wenn schon nicht optimale so doch möglichst gute Stoffwechseleinstellung zur Vermeidung diabetischer Gefäßkomplikationen zu erzielen, zeigte sich die Schwierigkeit einer lückenlosen Überwachung der Patienten. Es stellte sich somit immer mehr das Problem einer einerseits effektiven andererseits aber auch wirtschaftlich vertretbaren Betreuung des diabetischen Patienten.

Diese Anforderungen wurden teilweise durch die Entwicklung neuer automatisierbarer Glukosetestmethoden erfüllt. Besonders die Einführung der Blut- und Urinzuckerbestimmung durch Teststreifen, die der Patient selber zu Hause durchführen kann, waren ein großer Fortschritt.

Bei allen diesen Methoden, insbesondere bei der Teststreifenmethode mit anschließender reflektometrischer Konzentrationsbestimmung, ist die Mitarbeit des Patienten aber in einem Maße erforderlich, die ihn vielleicht sogar überfordert.

Eine engmaschige Kontrolle der Glukosekonzentration ist aber wegen der zu verhütenden Komplikationen notwendig. Die Anforderungen (geringe Belastung des Patienten, zuverlässiger Maßstab für die Stoffwechseleinstellung) ist durch die seit einigen Jahren zur Diabetesüberwachung angewandte Bestimmung der glycosylierten Hämoglobine (HbA_1) erfüllt.
Um welche Art von Hämoglobin handelt es sich dabei und warum ist dieses Hämoglobin zur Glukosestoffwechselüberwachung geeignet?
Das normale menschliche Hämoglobin (HbA) besteht zu 97 % (5) aus zwei Paaren von Globinketten: je zwei alpha-und zwei beta-Ketten. Die alpha-Ketten setzen sich aus 141 Aminosäuren und die beta-Ketten aus 146 Aminosäuren mit jeweils bekannter Aminosäurensequenz und Struktur zusammen (Abb. 1).

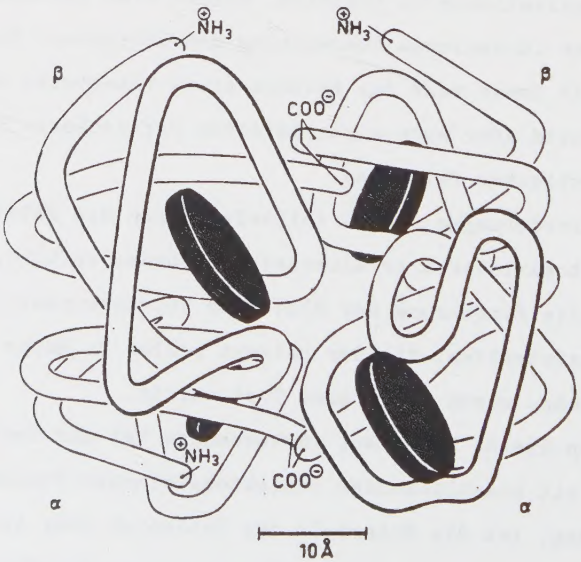
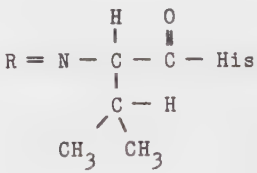


Abb. 1: Darstellung des Hämoglobinmoleküls bestehend aus 2 α und 2 β Ketten und den Porphyrinen

Die restlichen 3 % sind Hämoglobine, die in der Fetalzeit eine Bedeutung wegen der höheren Sauerstoffaffinität haben, sich aber in ihrem molekularen Aufbau vom normalen HbA unterscheiden. Es handelt sich dabei um HbF, das aus zwei alpha- und zwei gamma-Ketten und HbA_2, das aus zwei alpha- und zwei delta-Ketten besteht. Die gamma- und delta-Ketten haben wie die beta-Kette 146 Aminosäuren, unterscheiden sich aber in der Aminosäurenzusammensetzung.
1955 wurden verschiedene kleinere Fraktionen des menschlichen Hämoglobins bei der elektrophoretischen durch Kunkel (42)und chromatographischen Aufarbeitung durch Morrison (48) nachgewiesen. Allen und Mitarbeiter (3) verbesserten die chromatographische Methode durch Verfeinerung der Pufferzusammensetzung. Er beschrieb zwei Fraktionen des normalen Erwachsenenhämoglobins: A_1 und A_2, die in einem Verhältnis von 10% zu 90% stehen. Bei A_2 handelt es sich um das normale menschliche Hämoglobin HbA. Bei Auftrennung der kleineren Fraktion, die auch schnell wanderndes Hämoglobin genannt wird, da sie einen Ionenaustauscher schneller als A_2 durchläuft, zeigten sich noch drei Subfraktionen: A_{1a}, A_{1b}, A_{1c}. Diese Subfraktionen nach der Reihenfolge ihrer Elutionen bezeichnet, stehen in einem Verhältnis von 1:1:3. Dabei macht das A_{1c} den größten Anteil von 40-60 % am gesamten A_1 aus. Jones (36) zeigte 1961, daß HbA_{1c} und HbA die gleiche Aminosäurensequenz und Struktur und auch nahezu das gleiche Molekulargewicht haben. Es konnte sich also nicht um eine Hämoglobinanomalie (Hämoglobine, die in einer oder mehreren Ketten

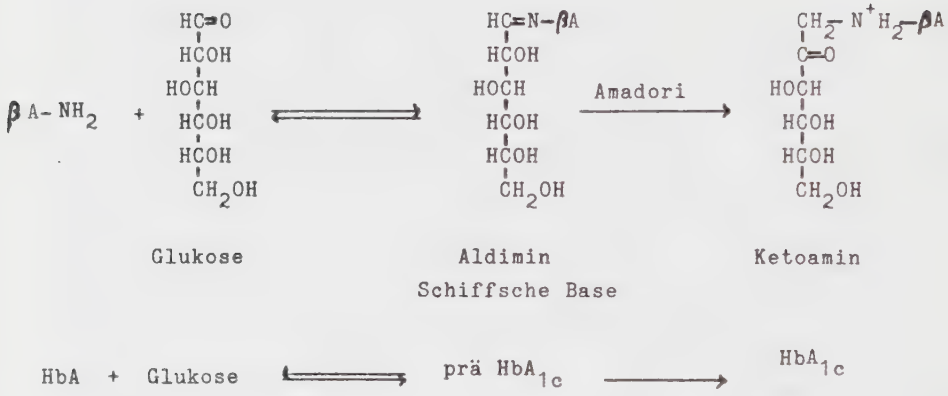
falsche Aminosäuren eingebaut haben) oder um die schon erwähnten physiologischen in sonst nur geringen Prozentsätzen vorkommenden Hämoglobine (HbF, HbA_2) handeln.
Der einzige Unterschied zwischen den beiden Hämoglobinen HbA und HbA_{1c} ist eine chemische Veränderung an der letzten Aminosäure, dem Valin der beta-Kette des HbA_{1c}.
Holmquist (32) postulierte 1966 weiter, daß es sich bei dieser Veränderung um ein Kondensationsprodukt, eine Schiffsche Base, zwischen der N-terminalen Aminogruppe, also dem Valin des normalen menschlichen HbA und einem Keton oder Aldehyd handelt:



Erst Bookchin und Mitarbeiter (8) haben das unbekannte Molekül "R" 1968 weiter differenzieren und als Hexose beschreiben können. Zur gleichen Zeit berichtete Rhabar (57) von einer Studie mit 1200 Patienten, in der das Hämolysat von zwei Patienten eine unbekannte schnell wandernde Hämoglobinfraktion in der elektrophoretischen Aufarbeitung zeigten. Beide Patienten waren an Diabetes mellitus erkrankt.

Als von Rhabar (58) 1969 wiederum das Hämolysat von Diabetikern untersucht wurde, zeigte es erneut diese von ihm als "Diabetische Komponente" bezeichnete schnell wandernde Fraktion in der chromatographischen Aufarbeitung.
Diese "Diabetische Komponente" konnte auch im Hämolysat von gesunden Probanden nachgewiesen werden und zeigte dieselben chromatographischen Eigenschaften wie HbA_{1c}.
Wegen dieser identischen chromatographischen Eigenschaft kam Rhabar zu dem Schluß, daß es sich bei der "Diabetischen Komponente" und dem schon bekannten HbA_{1c} um dieselbe Verbindung handelt. Der prozentuale Anteil des HbA_{1c} bzw. der "Diabetischen Komponente" vom Gesamthämoglobin beträgt bei Diabetikern (58) 7,5-10,6%, bei Nichtdiabetikern 4-6%.
Schon 1962 ist ein Anstieg des HbA_1 bei Patienten mit Diabetes mellitus beobachtet worden, allerdings erst nach Behandlung mit oralen Antidiabetika (33). Über dieses Phänomen ist damals nicht weiter berichtet worden.
Die endgültige Aufklärung der Struktur und Bildung von HbA_{1c} gelang erst Bunn (11) 1975.
Die vorher erwähnte Hexose wurde als Glukose erkannt,die sich im Erythrocyten an das Hämoglobin in der schon bekannten Schiffschen Base anlagert, aber in einer weiteren Reaktion, der Amadori-Umlagerung in das chemisch stabilere Ketoamin umgewandelt wird (Abb.2).

Abb. 2: Bildung von HbA_{1c} aus HbA und Glukose



Diese Bildung läuft über die gesamte Lebensspanne des Erythrozyten in einer nichtenzymatischen relativ langsamen Reaktion ab, wobei die Amadori-Umlagerung nahezu irreversibel ist(38,68). In vitro Versuche bestätigen die nichtenzymatische Natur dieser Reaktion(21).

Dabei werden nicht nur die beta-Ketten am Valin des HbA glycosyliert, sondern auch noch verschiedene andere Aminosäuren (z.B. Lysin) an den alpha-Ketten(13,63).

Diese glycosylierten Hämoglobine werden mit der chromatographischen Methode in einer Fraktion eluiert und laufen unter dem Terminus HbA_1 (HbA_1 = HbA_{1a}+ HbA_{1b}+ HbA_{1c}).

Die Struktur von HbA_{1b} ist noch nicht aufgeklärt. Es wird aber allgemein angenommen, daß es sich um eine Vorstufe von HbA_{1c} oder um andere Glycosylierungsprodukte handelt (31).

Phosphorylierte Glukose und Fruktose verbinden sich auch mit HbA. Bei HbA_{1a} handelt es sich um das Glycosylierungsprodukt zwischen HbA und Fruktose 1-6 Diphosphat(45).

Parallel zu diesen biochemischen Untersuchungen erschienen zahlreiche Veröffentlichungen, die sich mit der klinischen Bedeutung dieser Ergebnisse befassen.

Da die Glycosylierung nahezu ireversibel während der gesamten Lebensdauer des Erythrozyten von ca.120 Tagen abläuft, müßte das so entstandene HbA_{1c} ein Maß für die Glukoseexposition des Erythrozyten sein und somit den durchschnittlichen Blutzuckerspiegel in der Lebenspsanne des Erythrozyten wiedergeben.

Es zeigte sich, daß ältere Erythrozyten einen höheren HbA_{1c}-Wert aufweisen, da sie längere Kontaktzeiten mit Glukose haben als jüngere Erythrozyten (19,20,54). Sowohl bei Nichtdiabetikern (3,1% zu 6,0%) als auch bei Diabetikern (5,1% zu 10,1%) ist der HbA_{1c} Wert in älteren Erythrozyten erhöht. Auch bei Patienten, die eine hämolytische Anämie haben, fanden sich erniedrigte HbA_{1c} Werte, da die Lebensdauer der Erythrozyten bei dieser Erkrankung erheblich reduziert ist (12,55).

Weitere Studien beschäftigten sich mit HbA_1 als einen Parameter zur Entdeckung und Überwachung des Diabetes mellitus (10,18,30,34,56). Es wurde dabei davon ausgegangen, daß das eigentlich glycosylierte HbA_{1c} in einem festen Verhältnis zum Gesamt-HbA_1 steht, so daß es ausreicht HbA_1 zu bestimmen, um eine Aussage über die Glycosylierung des Hämoglobins treffzu können.

Durch die Entwicklung einer modifizierten und vereinfachten Mikrosäulenchromatographietechnik zur HbA_1-Bestimmung, konnten diese Studien auch außerhalb speziell ausgerüsteter Zentren betrieben werden(1,43,71,72).

Es fanden sich signifikante Korrelationen zwischen HbA_1, dem Nüchternblutzucker und den Ergebnissen eines Glukosetoleranztestes bei Diabetikern (25,27,41). Auch die tägliche Glukoseausscheidung im Urin korreliert gut mit dem HbA_1. Die beste Korrelation besteht zwischen HbA_1 und der Uringlukose, die zwei Monate vorher bestimmt worden ist(23). Nach 2-3 monatiger medikamentöser und diätetischer Therapie eines neu entdeckten Diabetes mellitus reduzierten sich die vorher hohen HbA_1 Werte auf Normalwerte (40).

Alle diese Befunde sprechen für den Nutzen der HbA_1-Bestimmung bei der Diagnostik und Überwachung des Diabetes mellitus (29,50).

Da man auch annehmen kann, daß verschiedene Proteine in derselben Weise verändert werden wie HbA zu HbA_{1c}, sind die glycosylierten Hämoglobine ein bekanntes Beispiel für Proteinveränderungen beim Diabetes mellitus. Diese Proteinveränderungen sind eventuell für die diabetischen Spätfolgen verantwortlich (9,39,59,65). Daher ist es von klinischem Interesse die Bildungsbedingungen dieser veränderten Hämoglobine zu kennen, um Rückschlüsse auf andere Proteinveränderungen ziehen zu können.

Die Abnahme des HbA_1 Wertes (off-rate) ist weitgehend untersucht worden (17,22,40). Bisher aber liegen nur wenige in

vivo Studien über den Anstieg (on-rate) des HbA_1 vor (26). Diese Arbeit will daher die Frage beantworten, welchen Effekt verschiedene Glukosekonzentrationen und Kontaktzeiten auf den Erythrozyten und somit auf das HbA_1 in vivo haben. Außerdem wird versucht, eine Aussage zur Zweckmäßigkeit der HbA_1 Routinebestimmung in der Diabetes mellitus Überwachung zu treffen.

2. VERSUCHSBEDINGUNGEN

2.1. Versuchspersonen

Die Versuche wurden an zwei unabhängigen Gruppen durchgeführt. Die erste Gruppe bestand aus zehn ambulanten Patienten (im Alter von 41 bis 69 jahren) mit Diabetes mellitus Typ II. Sie werden im weiteren als Gruppe 1 bezeichnet (Tab.1).
Die zweite Versuchsgruppe bestand aus neun freiwilligen Probanden im Alter von 22 bis 30 Jahren, die klinisch gesund waren, inbesondere keinen Diabetes mellitus oder eine andere Stoffwechselanomalie aufwiesen. Sie werden im weiteren als Gruppe 2 bezeichnet (Tab.1).

2.2. Versuchsanordnung

Um unter verschiedenen Bedingungen die quantitativen Beziehungen zwischen der Glukoseexposition des Hämoglobins und der HbA_1-Bildung zu untersuchen, sind zwei Formen der Glukosebelastung angewandt worden.
In der Gruppe 1 erfolgte eine ein-minütige intravenöse Bolusinjektion von 0,5 g/kg KG in Form einer 50% Lösung.
Die zweite Gruppe der Stoffwechselgesunden erhielt ebenfalls eine intravenöse Infusion mit 10%iger Glukoselösung über einen Zeitraum von 360 Minuten und zwar :

- bei einer Versuchsperson mit einer Zufuhrrate von 1,0 g Glukose/kg KG/h
- bei zwei Versuchspersonen mit einer Zufuhrrate von 1,5 g Glukose/kg KG/h
- bei sechs Versuchspersonen mit einer Zufuhrrate von 2,0 g Glukose/kg KG/h

Die Infusion wurde mit einer regelbaren Pumpe (Fa. Harvard App. Co. Dover) durchgeführt.
Bei beiden Versuchsgruppen erfolgte in jedem Falle die Glukosezufuhr in eine Cubitalvene, die Blutentnahme erfolgte mit Hilfe einer Verweilkanüle aus dem jeweils anderen Arm. Um möglichst einheitliche Versuchsbedingungen zu erhalten, begannen die Untersuchungen morgens um acht Uhr an nüchternen Probanden und Patienten. Für die Dauer der Glukosezufuhr wurde keine Nahrung zugeführt.

2.3. Blutproben:
Die Blutentnahmen erfolgten zur Bestimmung folgender Parameter:
- HbA_1
- Blutglukose

Bei den Patienten der Gruppe 1 wurden jeweils kurz vor Infusionsbeginn, dann nach 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 60 und 180 Minuten Blutentnahmen durchgeführt und zwar wurde für die HbA_1 Bestimmung 1 ml Blut in EDTA-Röhrchen, für die Glukosebestimmung 2 ml Blut in EDTA-Röhrchen gesammelt.
Bei der Gruppe 2 wurde nach Abnahme eines Ausgangswertes vor Infusionsbeginn in den ersten 120 Minuten alle 15 Minuten, dann bis 360 Minuten alle 30 Minuten und schließlich nach Beendigung der Infusion Blut zur HbA_1- und Glukosebestimmung abgenommen. Bei beiden Gruppen erfolgte auch nach 24 Stunden eine Blutentnahme.
Die Blutproben für die HbA_1-Bestimmung wurden sofort weiterverarbeitet.

2.4. Bestimmung der Parameter

2.4.1. Glukosebestimmung im Blut

Die Glukosebestimmung erfolgte nach der Glukose-Oxidase-Peroxidase-Methode.

Prinzip:

Die Reaktion besteht aus einer Hauptreaktion von Glukose mit Glukose-Oxidase (GOD), wobei H_2O_2 entsteht und einer Indikatorreaktion.

Das stöchiometrisch entstandene H_2O_2 wird mittels Peroxidase (POD) und einem Chromogen als H-Donator in der Indikatorreaktion unter Farbstoffentwicklung und Wasserfreisetzung umgesetzt.

Das Chromogen wird dabei stöchiometrisch zu H_2O_2 und damit stöchiometrisch zur Glukosemenge in ein Produkt umgewandelt, das quantitativ in einem Photometer bei 436 nm erfaßt werden kann.

$$\text{Glukose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Glukonsäure} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{I-H}_2 \xrightarrow{\text{POD}} 2\ H_2O + \text{I}$$

Der Indikator I, auch Chromogen genannt, ist in der reduzierten Form farblos, in der oxidierten Form aber gefärbt.

Ausführung:

0,1 ml Blut werden mit 1 ml Perchlorsäure (0,33 Mol/l) zur Proteinfällung in Zentrifugengläsern gemischt und 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Dann versetzt man 0,1 ml

des Überstandes und 0,1 ml der Standardlösung(0,505 mMol Glukose/l) jeweils mit 5,0 ml Glukosereagenz (Firma Boehringer, 20 µg Peroxidase/ml, 180 µg Glukoseoxidase/ml, 0,5 ng/ml ATBS (Ammoniumsalz als Indikator) und läßt es 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Gemessen wird in 1 cm Küvetten der Standard-Ansatz und die Analyse gegen den Leerwert (Glukosereagenz) im Photometer bei 436 nm.

Berechnung:

$$\frac{\text{Extinktion Analyse}}{\text{Extinktion Standard}} \times 5{,}55 = \text{mMol/l Glukose}$$

2.4.2. Hämoglobin HbA_1 Bestimmung

Der prozentuale Anteil des HbA_1 vom Gesamthämoglobin wurde mit der Mikrosäulenchromatographie bestimmt(1,43,62,71,72). In dieser Arbeit wurde das Isolab " Fast Hemoglobin Test System " der Firma Panchem Kleinwallstadt benutzt, bestehend aus:

- Hämolysereagenz
  0,1 g Saponin
  0,5 g KCN
  aqua dest. ad 100 ml

- Elutionslösung Nr. 1
  Natrium-Phosphat-Cyanid-Puffer, 0,051 Molar,pH 6,74

4,59 g NaH_2PO_4 H_2O

1,18 g Na_2HPO_4

0,65 g KCN

aqua dest. ad 1000 ml

- Elutionslösung Nr. 2

Natrium-Phophat-Puffer, 0,15 Molar, pH 6,4

14,35 g NaH_2PO_4 H_2O

6,25 g Na_2HPO_4

aqua dest. ad 1000ml

- Mikrosäule

Bei der Mikrosäule handelt es sich um eine zu 2/3 mit Harz(Bio-Rex 70)gefüllte Plastiksäule mit einer Höhe von 70 mm und einem Durchmesser von 10 mm. Die oberen zwei Zentimeter dieser Säule sind trichterförmig auf 15 mm erweitert. Die unteren 15 mm verlaufen konisch, sodaß nur noch eine Öffnung von etwa 2 mm im Durchmesser als Ablauf verbleiben. Der obere Rand des Austauscherharzes ist mit einer porösen Membran bedeckt.

Prinzip:

Das Prinzip beruht auf einem Kationenaustausch. An die negativ geladene Austauschermasse der chromatographischen Säule sind relativ locker gebundene Kationen angelagert. Wenn nun das vorher hergestellte Erythrozytenhämolysat in einem leicht sauren pH durch die Säule fließt, nehmen die Hämoglobinproteine die Bindungsstellen der locker gebundenen Kationen ein. Bei Zugabe eines Puffers mit einem pH Wert von 6,7-6,8 werden negativer geladene und somit leichter gebundene Hämoglobine durch positiv geladene Pufferbestandteile ersetzt und eluiert. In der so gewonnenen Fraktion befinden sich die schnell wandernden Hämoglobine HbA_{1a+b+c} da sie durch die zusätzlichen Glukosemoleküle negativer geladen sind als HbA. Um noch das restliche Hämoglobin von seinen Bindungsstellen lösen zu können, wird ein zweiter Puffer mit niedrigerem pH (6,4) auf die Säule aufgetragen. Den jeweiligen Pufferlösungen ist noch KCN zugefügt, um das Hämoglobin in eine gefärbte Komplexverbindung zu überführen (Cyanmethämoglobin). Die Absorption dieser Verbindung kann dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 415 nm bestimmt werden.

Ausführung:

50 µl Blut einer kurz vorher entnommenen Probe werden mit 200 µl Hämolysierungsreagenz (FA Panchem) gemischt und unter gelegentlichem Schütteln 10 Minuten stehengelassen. 50 µl dieses Hämolysates werden nun auf die poröse Membran, die das Austauscherharz nach oben abschließt mit einer Mikropipette aufgetragen. Anschließend wird 4 ml der Elutionslösung Nr. 1 (Firma Panchem) auf die Säule aufgebracht. Die Lösung fließt innerhalb von 30 Minuten durch die Säule, wird in einem Sammelröhrchen aufgefangen und erfaßt die Hämoglobine HbA_{1a+b+c} Nach Beendigung dieses Vorgangs wird mit einer Elutionslösung Nr. 2 genauso verfahren und das Eluat ebenfalls in einem Röhrchen gesammelt. Da es sich bei der Fraktion Nr. 2 um das "Restliche Hämoglobin" handelt, wird hier mit 16 ml H_2O zum Erreichen des optimalen Konzentrationsbereiches verdünnt. Von beiden Fraktionen wird die Absorption in 1 cm Küvetten bei415 nm im Spektralphotometer gemessen. Als Leerwert dient H_2O.

Die Bestimmung des HbA_1 Wertes wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Berechnung:

Berechnet wird der prozentuale Anteil der HbA_1 Fraktion vom Gesamthämoglobin.

A: Absorption der Hämoglobine HbA_{1a+b+c}

B: Absorption der "Rest-Hämoglobine"

$$\% \ HbA_{1a+b+c} = \frac{A}{A + 5 \times B} \times 100$$

2.6. Statistische Berechnungen

Zur statistischen Aufarbeitung der Werte wurden der

Mittelwert $\bar{x}$

die Standardabweichung $s_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x}-x)^2}{n-1}}$

die Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}}$

der Variationskoeffizient $V_K = 100 \cdot \frac{s_x}{\bar{x}}$

bestimmt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Glukosewerte bei dem Injektionsversuch

In der Gruppe 1 (Typ II-Diabetiker) betrug der Nüchternblutzucker im Durchschnitt 159,3 +/- 28,1 mg/dl (8,9 +/-1,6 mmol/l) $\bar{x}$ +/- SEM bei großer individueller Schwankungsbreite (Tab.2, Abb.7). Nach der Injektion von 0,5 g Glukose/kg KG kam es zu einem steilen Anstieg der Blutglukosekonzentration. Diese erreichte mit 552,6 +/- 45,2 mg/dl (30,7 +/- 2,5 mmol/l) als Durchschnittswert aller 10 Probanden nach 3 Minuten sein Maximum bei einer Variationsbreite von 390 mg/dl (21,6 mmol/l) (W.S) bis 920 mg/dl (51,1 mmol/l) (E.M.).
Danach fällt die Blutglukosekonzentration kontinuierlich ab, liegt bei 60 Minuten 52 %, bei 180 Minuten noch 14 % über dem Nüchternwert und hat mit 166,9 +/- 91,2 mg/dl (9,3 mmol/l) nach 24 Stunden wieder den Ausgangswert erreicht.
Nebenwirkungen traten auch bei sehr hohen Glukosekonzentrationen nicht auf.

3.2. Glukosewerte bei den Infusionsversuchen

In der Gruppe zwei sind verschiedene Glukosekonzentrationen infundiert worden.
Bei der Infusion mit 1,0 g Glukose/kg KG/h stieg die Blutglukosekonzentration nach einem raschen Anstieg in der 60. Minute auf 375 mg/dl (20,8 mmol/l) siehe Tabelle 3 Abb. 8, fiel bis zur 180. Minute kontinuierlich ab und blieb bis zum Ende der Infusion in der 360. Minute auf einem nahezu konstanten Spiegel. In diesem "steady state", das heißt in einem Zustand,

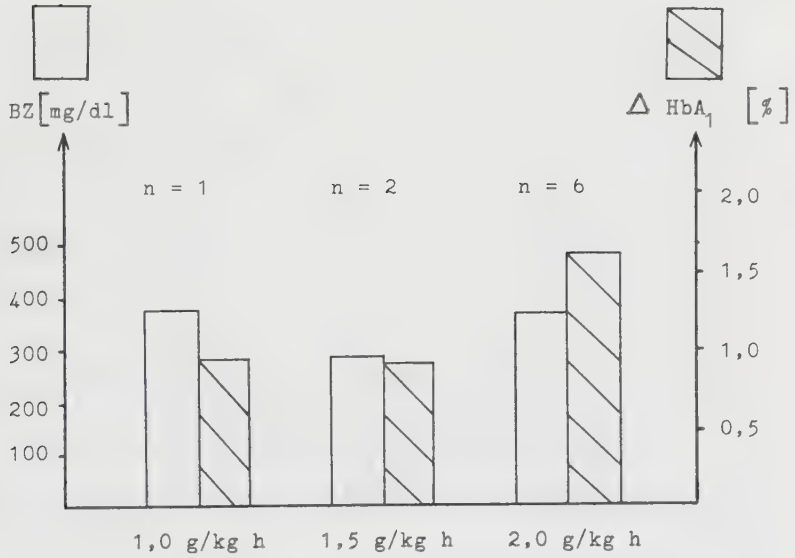
in dem die Glukosezufuhr mit dem Glukosestoffwechsel und der Glukoseausscheidung in einem Gleichgewicht steht, so daß ein nahezu konstanter Glukosespiegel aufrechterhalten werden kann, betrug der Blutzuckermittelwert 153,8 +/- 15,0 mg/dl (8,5 +/- 0,8 mmol/l) und war damit nur geringfügig über die Norm erhöht.

Während der Infusion mit 1,5 g Glukose/kg KG/h (Tab.4,Abb.9) betrug die maximal erreichte durchschnittliche Blutzuckerkonzentration in der 60. Minute 279,5 mg/dl (15,5 mmol/l). Das steady state wurde wiederum ab der 180. Minute erreicht, der Blutglukosemittelwert betrug dabei 146,9 +/- 11,4 mg/dl (8,2 +/-0,6 mmol/l). Eine Blutzuckerbestimmung 24 Stunden später ergab wieder Normalwerte.

Nachdem die Infusion mit 1,0 g und 1,5 g Glukose/kg KG/h von den Probanden gut toleriert worden ist, wurde die Glukosezufuhr auf 2,0 g Glukose/kg KG/h angehoben. Die hohe Glukosemenge wurde auch gewählt, weil wie es die gewonnenen Ergebnisse bestätigen, in den mit angemessenen Mitteln erreichbaren Expositionszeiten nur verhältnismäßig kleine HbA_1 Anteile am Gesamthämoglobin zu erwarten waren und damit kritische Meßbedingungen die Ungenauigkeit der Aussage erhöht hätten. Der Blutzuckerspiegel erreichte hier schon in der 45. Minute mit durchschnittlich 372,1 +/- 21,7 mg/dl (20,6 +/- 1,2mmol/l) den höchsten Wert (Tab. 5,Abb.10), bei einer Variationsbreite mit einem niedrigsten Wert von 280 mg/dl (15,5 mmol/l) und einem höchsten Wert von 406 mg/dl (22,5 mmol/l). Nach einem langsamen Abfall stellte sich ab der 150. Minute wieder ein nahezu konstanter Spiegel ein. Der Mittelwert nach Erreichen

des steady state lag bei 282,3 +/- 8,3 mg/dl (15,7 +/- 0,5 mmol/l) also 302 % über dem Nüchternblutzucker.
Bei drei Probanden kam es gegen Ende und kurz nach Beendigung der Infusion zu Übelkeit und Erbrechen.
Eine Gesamtaddition der Blutzuckerwerte der 1,0 - 1,5 - und 2,0 g Glukose/kg KG/h Infusionsversuche zeigt die Tab. 6 und Abb. 11 . In der 45. Minute wurde hier die höchste Blutzuckerkonzentration mit 347,4 +/- 22,1 mg/dl (19,3 +/-1,22 mmol/l) erreicht. Ab der 150. Minute stellte sich ein nahezu konstanter Blutzuckerspiegel ein. Die durchschnittliche Blutzuckerkonzentration im steady state lag bei 240,8 +/- 4,3 mg/dl (13,3 +/-0,2mmol/l).
Im wesentlichen wurden dieselben Ergebnisse während der Infusion mit 2,0 g Glukose/kg KG/h erzielt, wie bei den Infusionen mit geringerer Glukosekonzentration (Abb.3) , die maximal erreichten Durchschnittsglukosewerte unterschieden sich nur geringfügig.

Abb. 3: Höchste Blutglukose - und Δ HbA_1 Konzentration während verschiedener Infusionen



3.3. Hämoglobin HbA_1

3.3.1 Reproduzierbarkeit der Methode

Zur Beurteilung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der HbA1 Bestimmungsmethode mit der Mikrosäulenchromatographie wurde der HbA_1 Wert einer Blutprobe eines Stoffwechselgesunden und eines Diabetikers in einem Testdurchlauf zehn mal bestimmt (Intraassay Genauigkeit).

	Stoffwechselgesunder	Diabetiker
n	10	10
range	6,0-6,5 %	11,0-11,8%
$\bar{x}$	6,25%	11,54 %
s	0,18 %	0,23 %
VK	2,9 %	2,0 %

Zur Festlegung der Interassay Genauigkeit ist der HbA_1 Wert einer Blutprobe eines Diabetikers und eines Stoffwechselgesunden in zehn verschiedenen Testdurchläufen an aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt worden. Die Proben wurden bei 4 Grad Celsius aufbewahrt.

	Stoffwechselgesunder	Diabetiker
n	10	10
range	5,9-6,8 %	11,0-12,5 %
$\bar{x}$	6,32 %	11,78 %
s	0,26 %	0,44 %
VK	4,1 %	3,7 %

3.3.2. Aufstellung des Normalbereichs

Unter Normalbereich versteht den Bereich in dem 95% aller Werte einer Bestimmungsreihe liegen ($\bar{x} \mp 2s$).

Hierzu wurde der Anteil des HbA_1 am Gesamthämoglobin von 20 stoffwechselgesunden Probanden bestimmt(Abb.4,Tab.12),wobei zwischen den Geschlechtern nicht unterschieden worden ist.

n	20
range	4,3-7,0%
$\bar{x}$	5,99 %
s	0,65 %

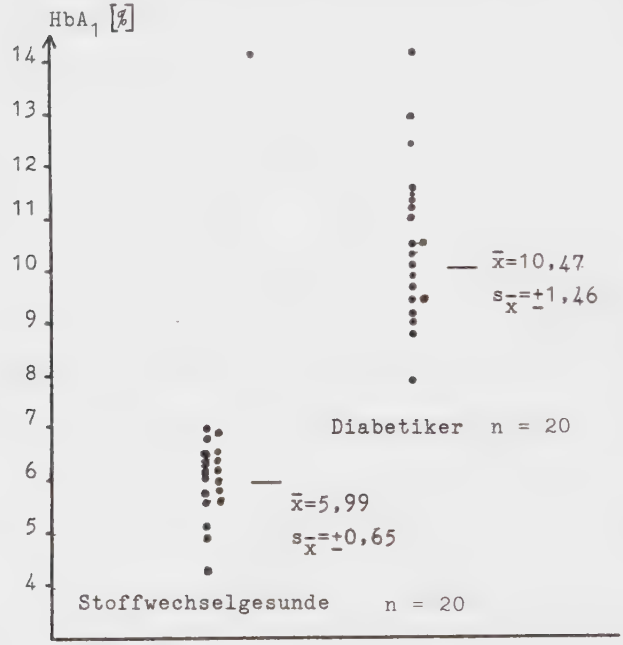
Der laboreigene Normalbereich des HbA_1 von gesunden Probanden betrug demnach 4,55 - 7,49 %

Bei Patienten mit einem veränderten Glukosestoffwechsel lag der 95% Bereich zwischen 7,55 -13,39 %

n	20
range	7,8-14,2%
$\bar{x}$	10,47 %
s	1,46 %

Es traten keine Überschneidungen mit dem Normalbereich auf.

Abb. 4 : Hämoglobin A_1-Gehalt in Erythrozyten von stoffwechselgesunden Probanden und Diabetikern



3.3.3. Korrelation mit dem Nüchternblutzucker

Ein hoher Korrelationskoeffizient zwischen Nüchternblutzucker und HbA_1 bei Diabetikern - in der Literatur schon mehrfach beschrieben (41) - konnte mit r = 0,85 in dieser Arbeit erneut bestätigt werden(Abb. 5, Tab. 12).

Einen schlechteren Korrelationskoeffizienten von r = 0,43 zwischen HbA_1 und Nüchternblutzucker wies das Kollektiv der stoffwechselgesunden Probanden auf(Abb. 6, Tab. 12).

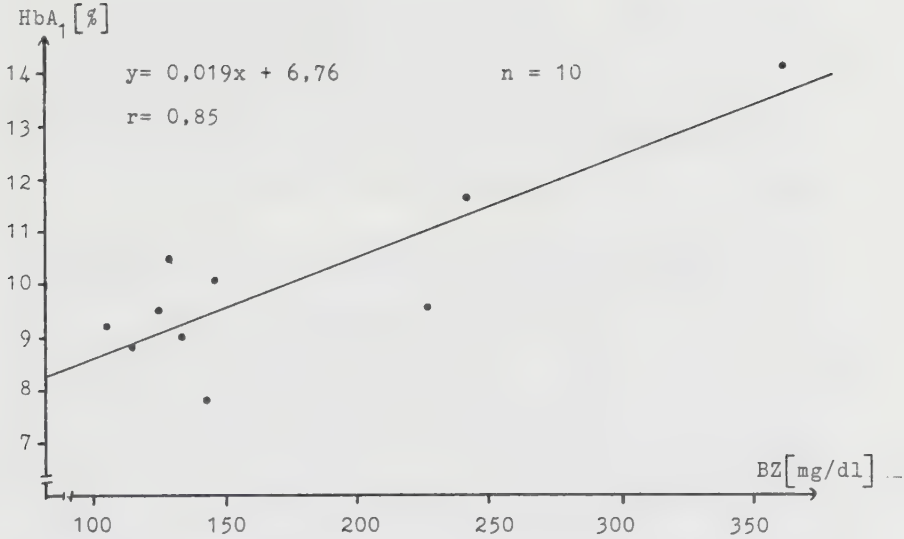


Abb. 5: Korrelation zwischen Nüchternblutzucker und HbA_1 bei Diabetikern

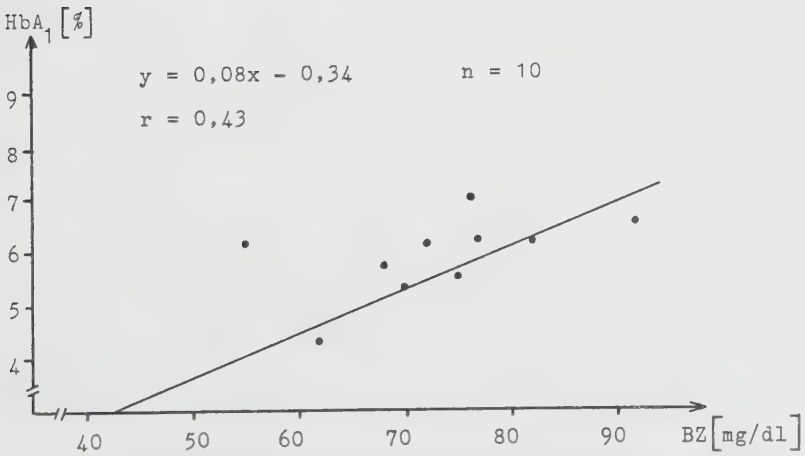


Abb. 6: Korrelation zwischen Nüchternblutzucker und HbA_1 bei stoffwechselgesunden Probanden

3.3.4. Hämoglobin A_1 Werte bei dem Injektionsversuch

Bei der Auswertung der Injektions- und Infusionsversuche wurden die HbA_1 Konzentrationen als Differenz der HbA_1 Werte zum Zeitpunkt Null und der darauffolgenden Zeiten berechnet, sodaß nur der Anstieg oder der Abfall unabhängig vom Ausgangswert angegeben wurde.

Dadurch wurde eine Beeinflußung der Auswertung durch unterschiedlich hohe Ausgangswerte vermieden.

Während der Injektion mit 0,5 g Glukose/kg KG stieg der Δ HbA_1 Wert innerhalb der ersten 3 Minuten parallel zur Blutglukose auf ein Maximum von durchschnittlich 0,74 +/- 0,2% ($\bar{x}$ +/- SEM) Δ HbA_1 an (Tab. 7 und 8, Abb.7).

Δ HbA_1 fiel danach kontinuierlich, weiterhin parallel zur Blutglukose, ab und lag 3 Stunden nach der Injektion noch um 0,1 +/- 0,03 % über dem Ausgangswert.

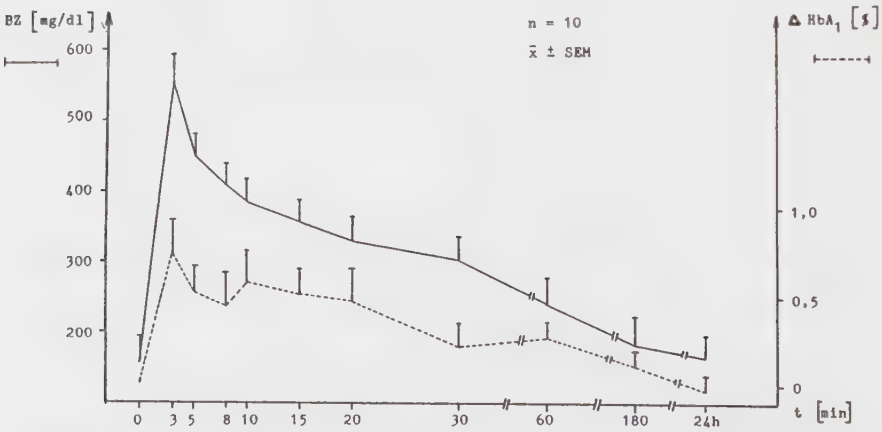


Abb. 7: Blutglukose und Δ HbA_1 Werte von Patienten der Gruppe 1 während der Glukoseinjektion mit 0,5 g Glukose/kg KG in einer Minute

24 Stunden später lag der Δ HbA_1 Wert mit - 0,09 +/- 0,03% ($\bar{x}$ +/- SEM) geringfügig über dem Ausgangswert.
Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Δ HbA_1 und Blutzuckerkonzentration mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,94$ ($p < 0,001$).

3.3.5. Hämoglobin A_1 Werte bei den Infusionsversuchen

Während der Infusion mit 1,0 g Glukose/kg KG/h stieg der maximale Δ HbA_1 Wert in der 75. Minute auf 0,9 % an (Tab.3, Abb.8). Δ HbA_1 verlief nicht ganz parallel zur Blutglukosekonzentrationskurve, fiel aber nach Beendigung der Glukosezufuhr ab und war mit Δ HbA1 = 0,1 % 24 Stunden später fast wieder auf den Wert vor der Infusion angelangt.
Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient zwischen Blutzuckerkonzentration und Δ HbA_1 von $r = 0,26$ ($p < 0,05$).

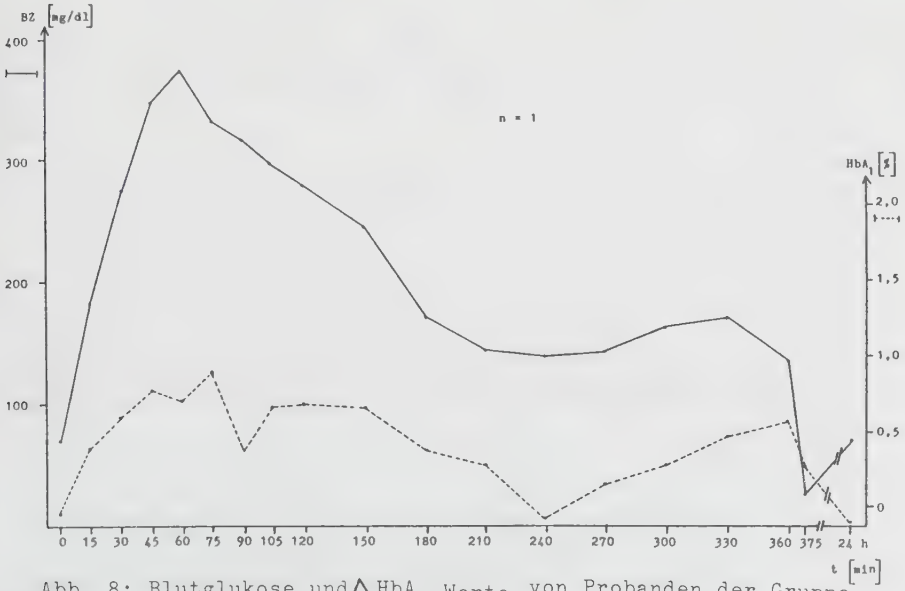


Abb. 8: Blutglukose und Δ HbA_1 Werte von Probanden der Gruppe 2 während der Glukoseinfusion mit 1,0 g/kg KG/h

Bei der Infusion mit 1,5 g Glukose/kg KG/h (Abb. 9, Tab.9) kam es wiederum nach einem steilen Anstieg in der 60. Minute zu einem Maximum mit 0,85 % $\triangle HbA_1$. Ab der 180. Minute stellte sich nahezu ein Gleichgewicht mit einem Mittelwert von 0,2 +/- 0,1 % $\triangle HbA_1$ ein.

Der HbA_1 Wert sank nach Beendigung der Infusion und hatte nach 24 Stunden einen um 0,25 % höheren Wert als vor der Infusion erreicht.

Der Korrelationskoeffizient zwischen Blutzuckerkonzentration und $\triangle HbA_1$ betrug r = 0,37 ($p < 0,05$).

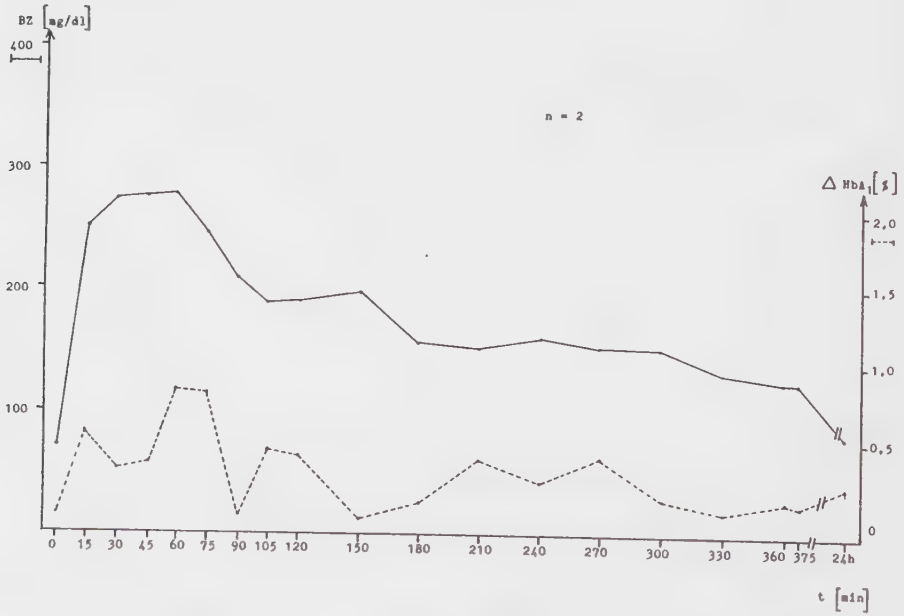


Abb. 9: Blutglukose und $\triangle HbA_1$ Werte von Probanden der Gruppe 2 während der Glukoseinfusion mit 1,5 g/kg KG/h

Da die Fallzahlen bei der Zufuhr von 1,0 g (n = 1) und 1,5 g (n = 2) Glukose/kg KG/h gering sind, ist der Versuch mit 2,0 g Glukosezufuhr sicher am aussagekräftigsten.
Bei der Infusion mit 2,0 g Glukose liegt ein nahezu paralleler Verlauf der ΔHbA_1 Kurve zur Blutzuckerkurve vor (Tab. 10,11, Abb. 10). Der ΔHbA_1 steigt bis maximal 1,63 % schon in der 45. Minute an. Das ist ein um 91 % höherer Anstieg des ΔHbA_1 gegenüber der 1,0 g Glukosezufuhr-Werten und ein um 103 % höherer Anstieg gegenüber den 1,5 g Glukosezufuhr-Werten.
Ein konstanter HbA_1 Spiegel wurde ab der 150. Minute, vergleichbar mit der Blutzuckerkurve, bis zum Ende der Infusion erreicht. Der Mittelwert bewegte sich um 1,1 +/- 0,05% ΔHbA_1.
Nach Beendigung der Infusion fiel der HbA_1 Wert parallel mit der Blutzuckerkonzentration ab und war 24 Stunden später noch um 0,26% gegenüber dem Wert vor der Infusion erhöht. Es besteht ein Korrelationskoeffizient zwischen Blutzucker und ΔHbA_1 von $r = 0,65$ ($p < 0,05$).
Eine Gesamtaddition der ΔHbA_1 Werte von dem 1,0 - 1,5 - und dem 2,0 g Glukose/kg KG/h Infusionsversuchen zeigt die Tab. 6 und Abb. 11. Der ΔHbA_1 Wert erreicht mit 1,3 % in der 60. Minute das Maximum. Ein weitgehend konstanter Spiegel wurde wiederum ab der 150. Minute erreicht. Der Mittelwert im steady state lag bei 0,8 % ΔHbA_1. Nach Beendigung der Infusion fiel der ΔHbA_1 Wert ab, war aber 24 Stunden später noch um 0,22 % gegenüber dem Wert vor der Infusion erhöht. Es besteht ein Korrelationskoeffizient zwischen Blutzuckerkonzentration und ΔHbA_1 von $r = 0,74$ ($p < 0,01$).

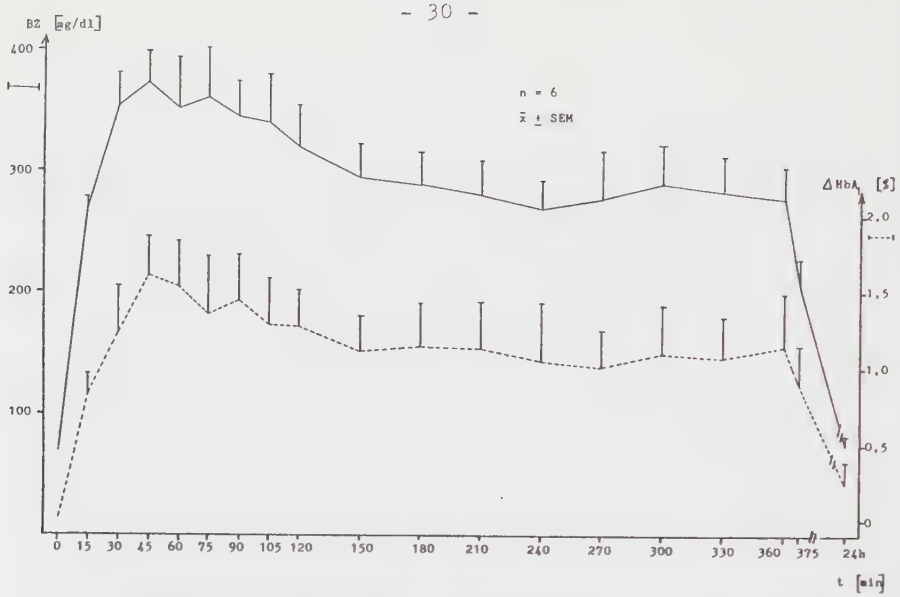


Abb. 10: Blutglukose und HbA_1 Werte von Probanden der Gruppe 2 während der Glukoseinfusion mit 2,0 g/kg KG/h

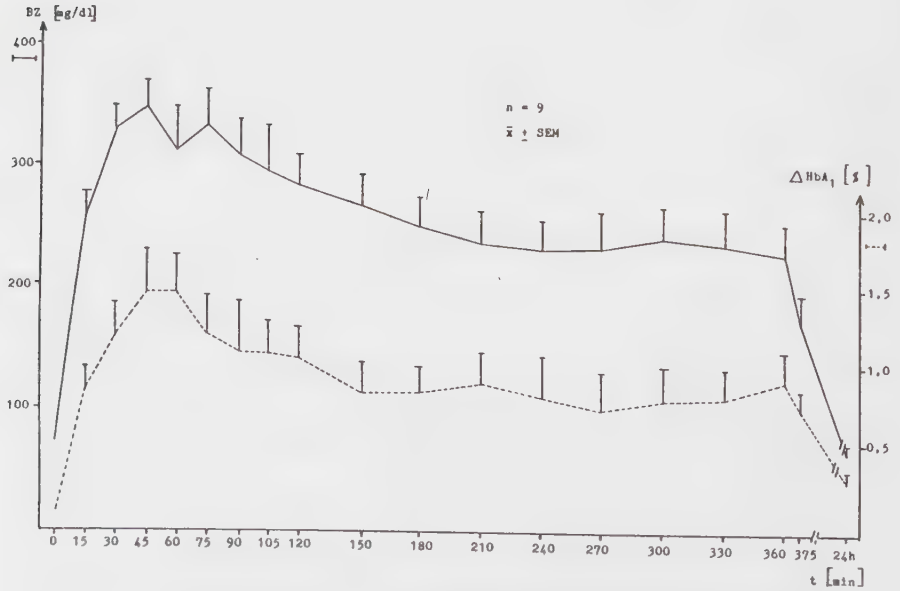


Abb. 11: Blutglukose und HbA_1 Werte von Probanden der Gruppe 2 während der Glukoseinfusion mit 1,0 - 1,5 - 2,0

4. DISKUSSION

4.1. Methodenvergleich

Zur Bestimmung der glycosylierten Hämoglobine kommen mehrere Verfahren in Frage:

1. Chromatographische Techniken:
   - Makrosäulenchromatographie
   - Mikrosäulenchromatographie
   - Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)
2. Colorimetrische Bestimmung (Thiobarbitursäure (TBA) - Methode
3. Elektrophoretische Bestimmung
4. Spektroskopisches Verfahren
5. Radioimmunologisches Verfahren

Die glycosylierten Hämoglobine wurden erstmalig von Allen (3) mit der Makrosäulenchromatographie isoliert und von Trivelli (34) mit derselben Methode quantifiziert. Da diese Art der Chromatographie etwa 4 Stunden benötigt, bis das Eluat durch den 50 cm langen Kationenaustauscher fließt, wurde von Cole (14) und Davis (16) eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie benutzt. Dabei wird das Eluat unter definierten Drucken durch die Säule gepreßt. Mit dieser Methode ist eine Bestimmung in 20 Minuten durchführbar, wobei auch zwischen HbA_{1a+b+c} differenziert werden kann. Für beide Verfahren sind als Min imum 3 ml Blut notwendig.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung des HbA_1 ohne größeren Labor-

aufwand bot die Entwicklung der Mikrosäulenchromatographie (37,43), die etwa zwei Stunden benötigt und die glycosylierten Hämoglobine als Gesamtfraktion HbA_1 eluiert.
Mit der colorimetrischen Methode von Flückiger und Winterhalter (21,24) wird selektiv die Ketoamin-Form des HbA_{1c} bestimmt (Abb. 2,12).

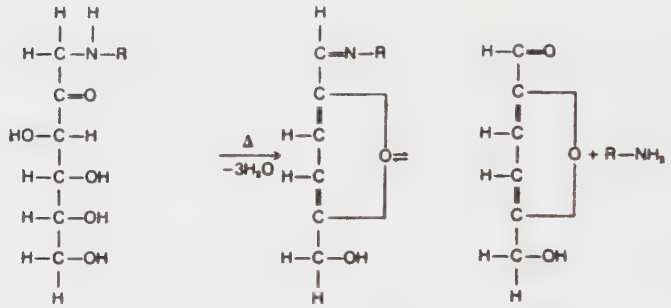


Abb. 12: Nachweis der Ketoamin-Form des HbA_1 durch die TBA - Methode

Zu der chromatographisch gewonnenen HbA_1 Fraktion wird Oxalat und Trichloracetat (TCA) hinzugefügt. Dabei bildet sich aus der Ketoamin-Verbindung des HbA_{1c} 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF), das mit Thiobarbitursäure (TBA) eine farbige Verbindung ergibt, die bei 443 nm spektroskopisch gemessen werden kann.

Die Bestimmung bei der elektrophoretischen Methode (46,69) wird auf Agar-Gel Platten durchgeführt. Bei einem pH von 6,5 mit einer Spannung von 60 V und anschließender Bestimmnung bei 420 nm im Densitometer können die einzelnen HbA_1 Fraktionen nachgewiesen werden.

Desweiteren ist ein spektroskopisches Verfahren entwickelt (47) worden, wobei die Bindung von 2,3-Diphosphoglycerat an Hämoglobin eine charakteristische Spektralverschiebung zustande kommen läßt. Diese Bindung an das Hämoglobin wird aber durch Glycosidierung des β endständigen Valins verhindert, wie es beim HbA_{1c} ja vorliegt.

Bei der radioimmunologischen Methode wird ein radioaktiv markiertes Schaf-Antiserum gegen HbA_1 benutzt(35).

Die beiden zuletzt genannten Methoden haben aber im klinischen Gebrauch keine Bedeutung erlangt, weil sie zu zeit- und personalaufwendig sind.

Bei allen diesen Verfahren ist eine gute Präzision beschrieben worden (41), mit Ausnahme der elektrophoretischen Bestimmung. Die Werte beziehen sich auf Diabetiker (Intraassay, n = 10) nach Niederau et al.

	VK [%]
- Makrosäulenchromatographie	2,5
- Mikrosäulenchromatographie	2,4
- Hochdruckflüssigkeitschromatographie	2,8
- Colorimetrische Bestimmung	3,6
- Elektrophoretische Bestimmung	10,8
- Spektroskopisches Verfahren	1,2

Die Ergebnisse decken sich mit den in dieser Arbeit erreichten Wert (Intraassay bei Diabetikern: 2,0 %).
Da die Makrosäulenchromatographie als Referenzmethode gilt, ist ein statistischer Vergleich der durch diese Methode gewonnenen Ergebnisse mit den durch die übrigen Methoden erreichten Werte eines Hämolysates von Bedeutung (53).

	Makrosäule
- Mikrosäule	r = 0,97
- HPLC	r = 0,88
- TBA	r = 0,89
- Elektrophorese	r = 0,88
- Spektroskopie	keine statistische Korrelation mit dem säulenchromatographischen Verfahren

Aus dem Vergleich dieser Ergebnisse geht hervor, daß das Mikrosäulenverfahren zuverlässige Werte liefert.
Da die mikrosäulenchromatographische Methode in dieser Arbeit benutzt wurde soll hier noch im einzelnen, auch im Hinblick auf die gewonnenen Werte, das Verfahren diskutiert werden.
Bei der Mikrosäulenchromatographie ist es im Gegensatz zur Makrosäulenchromatographie nicht möglich, zwischen HbA_{1a+b} und HbA_{1c} zu differenzieren, sondern es wird die gesamte Fraktion bestimmt. Auch kann nicht zwischen der Ketoamin-Form und der Aldimin-Form des HbA_{1c} unterschieden werden.

(Abb. 2).Die Möglichkeit der selektiven Darstellung der Ketoamin-Form bietet nur die colorimetrische Nachweismethode (Abb. 12). Auf die Bedeutung dieser gemeinsamen Bestimmung wird später noch eingegangen.

Wie bei allen chromatographischen Verfahren ist die Analyse mit der Mikrosäule temperaturabhängig (60). Die empirisch ermittelte optimale Temperatur für die Mikrosäule liegt bei 23 Grad Celsius. Bei Änderung der Säulentemperatur um etwa +/- 1 Grad Celsius verändert sich der HbA_1 Wert um etwa 10 % (62).

In dieser Arbeit wurden die HbA_1 Werte bei Raumtemperatur, die sicherlich Schwankungen unterlag, bestimmt. Obwohl es dadurch sicher zu Meßungenauigkeiten gekommen ist, unterscheiden sich die in dieser Arbeit gewonnenen HbA_1 Werte für Diabetiker und stoffwechselgesunde (Abb. 4) nicht wesentlich von denen anderer Arbeitsgruppen, die auch die Mikrosäulen-Methode benutzten (18,23,30,56,71). Auf die Versuchsauswertung werden Temperaturschwankungen allerdings keinen entscheidenden Einfluß haben, da nur der Anstieg oder Abfall als ΔHbA_1 zur Auswertung herangezogen wurde.

Die Ergebnisse bei der Bestimmung durch die Mikrosäule können auch durch erhöhtes HbF oder auch durch abnorme Hämoglobine verfälscht werden (2,64). Diese Hämoglobine werden zusammen mit dem HbA_1 eluiert und täuschen so einen scheinbar erhöhten HbA_1 Wert vor. In der Patienten- und Probandengruppe dieser Arbeit gab es keine hämatologischen Auffälligkeiten.

4.2. Hämoglobin A_1

Die in dieser Arbeit beschriebenen HbA_1 Werte für Stoffwechselgesunde ($\bar{x}$ = 5,99 %) und Diabetiker ($\bar{x}$ = 10,77) (Abb.4) liegen in den Bereichen, wie sie von anderen Arbeitsgruppen ermittelt worden sind. Hier eine Übersicht der Ergebnisse anderer Arbeiten:

HbA_1 [%] von	Stoffwechselgesunde	Diabetiker
- Trivelli (71)	6,5	11,0
- Dolhofer (18)	6,5	11,3
- Paulsen (56)	6,5	13,2
- Gabbay (23)	7,0	13,2
- Gonen (30)	7,4	12,5

4.2.1. In vitro Versuche

In vitro Versuche zur HbA_1 Bildung, von mehreren Arbeitsgruppen durchgeführt (52,66,70), zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Glukosekonzentration der Inkubationslösung und der Inkubationsdauer (Abb. 13,14).

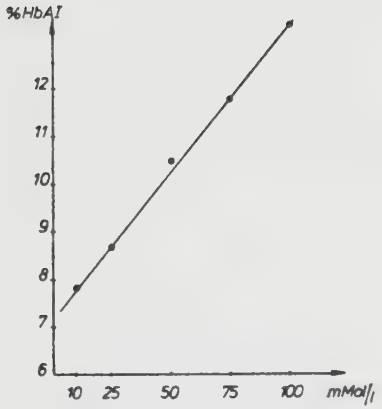


Abb. 13: Bildung von HbA_1 im Hämolysat in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration, Inkubationsdauer 8 Stunden (nach Niederau et al.)

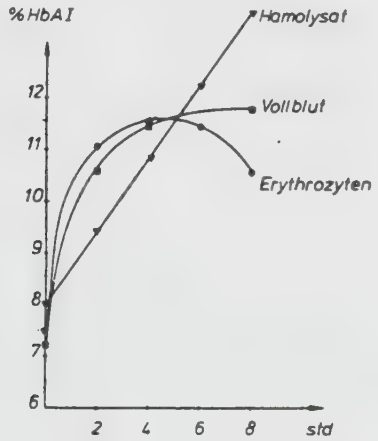


Abb. 14: Bildung von HbA_1 in Abhängigkeit von der Zeit bei konstanter Glukosekonzentration (50 mmol/l)
(nach Niederau et al.)

Bei der Glukoseinkubation von Erythrozyten erreicht die HbA_1 Konzentration eine Sättigung bei etwa vier Stunden, von Svendsen et al. (70) Abb. 15 und auch Niederau et al. (52) beschrieben, die unabhängig von der Höhe der Glukose - exposition ist.

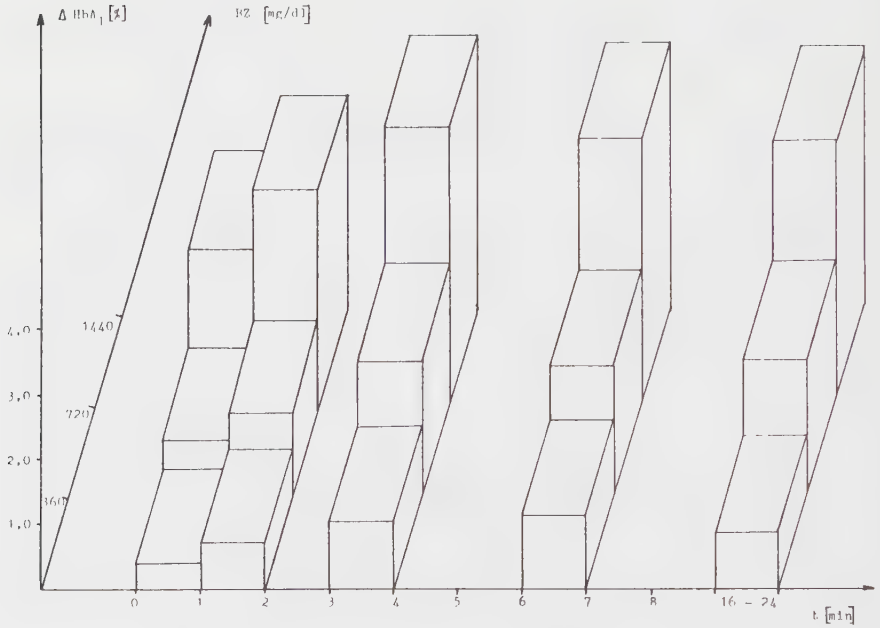


Abb. 15: Anstieg der HbA_1 Konzentration im Erythrozyten nach in vitro Inkubation mit Glukoselösung verschiedener Konzentration (Zeichnung nach Werten von Svendsen (70))

Niederau et al. erklärten diese Sättigung durch Laktatbildung intakter Erythrozyten und darauffolgendem pH Abfall, der eine weitere HbA_1 Bildung verhindert. Tatsächlich konnte experimentell durch eine Herabsetzung des pH Wertes die, nach vorheriger Inkubation, an das Hämoglobin von intakten Erythrozyten gebundene Glukose wieder abgelöst werden, sodaß der HbA_1 Wert auf den Ausgangswert absank (6) (Abb. 16).
Auch durch Dialyse gegen ein glukosefreies Medium konnte eine Abspaltung der vorher angelagerten Glukose erreicht werden (Abb. 17). Allerdings lag der HbA_1 Wert nach Dialyse umso höher, je länger vorher mit Glukose inkubiert wurde. Es konnte keine vollständige Trennung mehr erreicht werden bei Inkubationen die länger als sechs bis acht Stunden durchgeführt wurden.
Aus diesen Studien geht hervor, daß die in vitro Bildung von HbA_1 nicht in einem irreversiblen Schritt erfolgt, sondern sowohl durch pH Verschiebung in den sauren Bereich als auch durch Dialyse, wenn auch nur zum Teil, wieder reversibel ist.

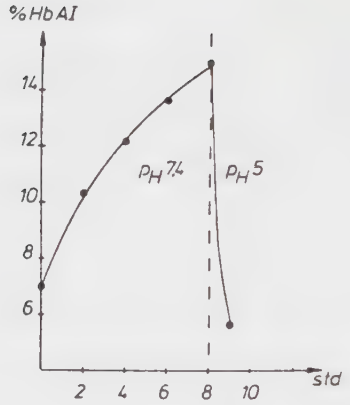


Abb. 16: Verminderung des HbA_1 durch pH Herabsetztung, nach vorheriger 8 stündiger Inkubation mit Glukose-Lösung (nach Niederau et al.)

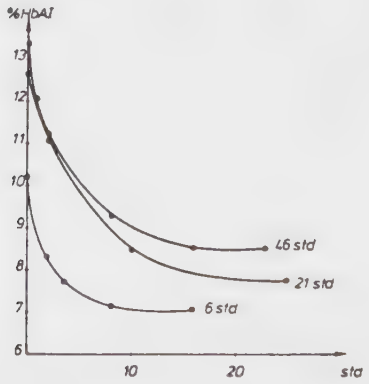


Abb. 17: Abfall des HbA_1 durch Dialyse gegen Ringer-Phosphat-Lösung nach vorheriger 6,21,46 stündiger Inkubation mit Glukoselösung (nach Niederau et al.)

4.2.2. In vivo Versuche

Die in vitro Erfahrungen mit der Bildung von HbA_1 konnten durch die in vivo Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden (26). Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg von HbA_1 unter Glukosebelastung, der aber nach Beendigung der Infusion oder Injektion wieder auf seinen Ausgangswert abfiel. Bei der reversiblen Verbindung, die sich bei der Glukoseexposition bildet, handelt es sich um das Aldimin (Schiffsche Base, Abb. 2). Diese Verbindung wird bei der Bestimmung durch die Mikrosäule mitgemessen. Diese Messung der Aldimin-und Ketoamin-Form zusammen täuscht demnach bei kurzfristigen Schwankungen der Blutzuckerkonzentration einen erhöhten HbA_{1c} Wert vor. Diese Schwankungen können nur vermieden werden, wenn die Erythrozyten vor der Bestimmung dialysiert werden (15) oder wenn das HbA_{1c} mit der TBA Methode nachgewiesen wird. Einige Autoren, die die HbA_1 Bestimmung nach dieser Methode durchgeführt haben oder die Aldimin-Form durch Dialyse abgetrennt haben, geben den labilen Anteil mit etwa 1,0 % vom Gesamthämoglobin A_1 an (15,28).

Die TBA Methode und das Dialysieren der Erythrozyten vor der Bestimmung von HbA_1 sind aber sicherlich zu zeit-und materialaufwendig, als daß sie zur Routinebestimmung in der Praxis benutzt werden könnten. Seit kurzem existiert für die Mikrosäule und die elektrophoretische Methode ein "Aldimin Eliminator", der es ermöglicht, die reversible Schiffsche Base nicht mehr in der Mikrosäulenchromatographie und der Elektrophorese nachzuweisen.(49,51).

Die Aussagekraft des durch Chromatographie nachgewiesenen HbA_1 Wertes wird somit beeinträchtigt (61).
Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, daß nicht einmal eine sechs stündige Glukoseexposition, mit hochpathologischen Blutzuckerwerten, in der Lage ist, eine irreversible Verbindung mit dem Hämoglobin zu bewirken. Dabei hat die absolut erreichte Glukosekonzentration während der Exposition anscheinend keinen Einfluß auf die irreversible HbA_1 Bildung. Weder bei einer niedrigen noch bei einer hohen Blutzuckerkonzentration während der Expositionszeit konnten langfristig erhöhte HbA_1 Werte erzielt werden.
Da die Bildungsbedingungen des stabilen HbA_1 noch nicht hinreichend bekannt sind, kann über mögliche Faktoren der Bildung nur spekuliert werden. Der Glukoseeinstrom in den Erythrozyten ist wahrscheinlich nicht der limitierende Faktor der HbA_1 Bildung. Denn schon nach wenigen Sekunden wird ein Konzentrationsgefälle von extra- nach intrazellulär und umgekehrt durch einen Glukoseein- oder ausstrom ausgeglichen (67). Auch konnte bei den Glukosebelastungen in dieser Arbeit nach wenigen Minuten der Glukoseexposition ein Anstieg des Gesamthämoglobin A_1 gemessen werden.
Es könnten andere Faktoren in der Zelle selber vorhanden sein, die die HbA_1 Bildung verursachen. Möglicherweise werden geringe Veränderungen in der Erythrozytenzelle durch erhöhte Blutzuckerspiegel bewirkt. Die intrazelluläre Glukose könnte bisher noch nicht bekannte Katalysatoren freisetzen, die wiederum erst die endgültige Bindung von

Glukose an das Hämoglobin ermöglichen. Diese potentiellen Katalysatoren werden eventuell schon bei gering erhöhten Blutzuckerkonzentrationen freigesetzt und bewirken dann eine irreversible Anlagerung von Glukose an das Hämoglobin, auch wenn die Blutzuckerspiegel schon wieder auf Normalwerte abgesunken sind.

In der vorliegenden Arbeit sind der letzte Blutzuckerwert und HbA_1 Wert 24 Stunden nach der Glukosebelastung bestimmt worden. Zu diesem Zeitpunkt ist kein wesentlicher Anstieg des HbA_1 zu verzeichnen gewesen.

Möglicherweise hätte mehrere Tage oder auch Wochen später ein erhöhter HbA_1 Wert gemessen werden können, obwohl zu diesem Zeitpunkt schon länger normoglykämische Werte existierten. Diese Beobachtung wurde von einer Arbeitsgruppe nach einem oralen Glukosebelastungstest (44) beschrieben.

Dort war die höchste HbA_1 Konzentration 30 Tage nach der Glukosebelastung gemessen worden. Allerdings konnte diese Beobachtung bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden. Die Faktoren, die zu einer stabilen HbA_1 Bildung führen, erfordern somit noch einer weitgehenden Aufklärung.

Die Bedeutung des HbA_1 Wertes muß mit einigen Einschränkungen betrachtet werden. Das HbA_1 eignet sich sicherlich nicht als alleiniger Parameter zur Einstellung und Überwachung eines Patienten mit Diabetes mellitus. Bei Veränderungen des HbA_1 Wertes bei einem zu überwachenden diabetischen Patienten muß der aktuelle Blutzuckerwert als

Parameter bei möglichen Therapieänderungen (Diät, Insulin, orale Antidiabetika) herangezogen werden. Wenn der labile Anteil des HbA_1 bei der Bestimmungsmethode eliminiert wird, der Schwankungen durch kurze Blutzuckerveränderungen vortäuschen kann, eignet sich der HbA_1 Wert zur Langzeitüberwachung. Es kann allerdings nur eine pauschale Aussage über die Einstellungsqualität eines Diabetikers getroffen werden. Insbesondere bedarf es noch weiterer Forschungsarbeit, um die bisher unbekannten Faktoren zu finden, die zur Bildung des stabilen HbA_1 beitragen.

4.3. Zusammenfassung

Glycosylierte Hämoglobine (HbA_1) enstehen aus dem normalen menschlichen HbA und Glukose, die sich während der Lebensspanne des Erythrozyten in einer nichtenzymatischen Reaktion an das Hämoglobin anlagert. Diese Bindung erfolgt in mehreren Schritten.

In der vorliegenden Arbeit ist die in vivo Bildung von glycosylierten Hämoglobinen bei unterschiedlichen Blutglukosekonzentrationen und Kontaktzeiten untersucht worden.

Dazu wurde 10 Patienten mit Diabetes mellitus (Typ II) 0,5 g Glukose/kg KG innerhalb von 1 Minute injiziert. 9 freiwil - ligen Probanden sind über 6 Stunden mit einer regelbaren Infusionspumpe unterschiedliche Glukoseraten zugeführt worden:

- 1 Versuchsperson 1,0 g Glukose/kg KG/h
- 2 Versuchspersonen 1,5 g Glukose/kg KG/h
- 6 Versuchspersonen 2,0 g Glukose/kg KG/h

Bei allen diesen Versuchen konnte ein HbA_1 Anstieg, parallel zum Blutzuckeranstieg beobachtet werden. Die Bestimmung erfolgte durch die Mikrosäulenchromatographie. Nach Beendigung der Infusion oder Injektion fiel der HbA_1 Wert wieder auf den Ausgangswert zurück. Die Bildung des HbA_1 erfolgt in zwei Schritten, wobei die Kontaktzeiten offenbar nicht ausreichten, um ein stabiles HbA_1 zu bilden. Die Faktoren, die zu einer Bildung des stabilen HbA_1 führen, bleiben auch weiterhin unklar.

Tab. 1: Persönliche Daten von 9 männlichen und weiblichen Probanden

Versuchsperson	Name	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	Geschlecht
1	W.B.	30	80	177	m.
2	P.S.	25	62	170	m.
3	C.S.	24	70	165	w.
4	U.K.	22	76	175	m.
5	P.D.	30	90	198	m.
6	I.H.	22	71	168	w.
7	C.K.	26	80	187	m.
8	H.N.	28	71	179	m.
9	C.K.	22	86	186	m.
	$\bar{x}$	25,4	76,2	178,3	

Persönliche Daten von 10 Patienten mit Diabetes mellitus

1	S.S.	44	70	174	m.
2	B.S.	69	79	168	w.
3	V.K.	64	58	159	w.
4	R.B.	69	75	172	w.
5	H.K.	41	56	170	m.
6	W.S.	49	75	180	m.
7	E.M.	48	80	173	m.
8	W.L.	55	55	158	w.
9	K.K.	63	83	179	m.
10	T.O.	61	74	169	w.
	$\bar{x}$	56,3	70,5	170,2	

Tab. 2: Blutglukosekonzentration von Patienten der Gruppe 1 während der Glukoseinjektion

Patient:	S.S.	B.S.	V.K.	R.B.	H.K.	B.S.	E.M.	W.L.	K.K.	T.O.			
t [min]	BZ [mg/dl]										$\bar{x}$	SD	SEM
0	124	240	141	226	104	80	360	95	127	96	159,3	89,0	28,1
3	427	527	506	588	576	390	920	560	529	503	552,6	143,3	45,2
5	333	468	463	513	420	340	660	400	432	468	449,7	93,3	29,4
8	349	443	407	477	358	305	590	356	388	390	409,3	81,0	25,6
10	309	410	385	483	328	285	560	336	366	393	385,7	83,5	26,2
15	300	400	349	465	290	262	530	292	347	332	356,7	85,1	26,8
20	257	375	314	429	260	208	540	268	308	332	329,1	97,5	30,7
30	247	370	307	396	206	202	490	256	261	307	304,2	91,2	28,8
60	299	340	201	366	78	99	424	160	187	263	241,7	115,7	36,4
180	145	300	136	251	87	101	422	92	166	120	182,0	109,3	34,5
24h	139	270	140	221	90	89	362	75	134	149	166,9	91,2	28,8

Tab. 3: Blutzuckerkonzentration, Hämoglobin A_1 und ΔHbA_1 Werte von einem Probanden der Gruppe zwei während der Infusion mit 1,0 g Glukose/kg KG

Patient: W.B.

t [min]	BZ [mg/dl]	HbA_1 [%]	ΔHbA_1 [%]
0	70	5,3	0
15	179	5,7	0,4
30	268	5,9	0,6
45	346	6,1	0,8
60	375	6,0	0,7
75	333	6,2	0,9
90	318	5,7	0,4
105	297	6,0	0,7
120	283	6,0	0,7
150	245	6,0	0,7
180	170	5,7	0,4
210	146	5,6	0,3
240	141	5,2	-0,1
270	146	5,5	0,2
300	165	5,6	0,3
330	173	5,8	0,5
360	136	5,9	0,6
375	27	5,6	0,3
24h	68	5,2	-0,1

Tab. 4: Blutzuckerkonzentration von Probanden der Gruppe 2 während der Infusion mit 1,5 g Glukose/kg KG

Patient:	P.S.	C.S.	
t[min]	BZ[mg/dl]		$\tilde{x}$
0	92	72	82,0
15	234	265	249,5
30	277	263	270,0
45	310	238	274,0
60	361	197	279,5
75	290	197	243,5
90	242	171	206,5
105	213	163	188,0
120	214	165	189,5
150	195	198	196,5
180	166	140	153,0
210	177	124	150,5
240	176	141	158,5
270	172	132	152,0
300	164	142	153,0
330	139	128	133,5
360	134	122	128,0
375	116	142	129,0
24h	91	78	84,5

Tab. 5: Blutzuckerkonzentration von Probanden der Gruppe 2 während der Infusion mit 2g Glukose/kg KG

Patient:	C.K.	U.K.	P.D.	I.H.	H.N.	C.K.			
t [min]	BZ [mg/dl]						$\bar{x}$	SD	SEM
0	77	68	76	62	55	82	70,0	10,2	3,7
15	264	292	340	240	270	253	276,5	35,6	20,9
30	383	343	387	300	420	292	354,2	51,3	19,1
45	406	349	384	354	460	280	372,1	60,6	21,7
60	394	274	345	323	500	267	350,5	87,0	31,7
75	379	279	402	358	520	237	362,5	99,3	40,5
90	407	265	338	334	445	277	344,3	70,7	28,8
105	539	209	287	338	415	268	342,6	118,6	48,4
120	438	223	286	338	400	239	320,6	86,9	35,4
150	362	237	235	308	386	241	294,8	67,5	27,5
180	329	235	221	337	360	240	287,0	61,4	25,0
210	345	216	183	333	350	257	280,6	72,1	29,4
240	236	220	213	332	344	272	269,5	56,9	23,2
270	253	188	190	313	433	286	277,1	91,4	37,3
300	255	210	216	357	406	299	290,5	78,8	32,1
330	237	210	221	349	368	320	284,1	69,6	28,4
360	222	195	239	342	365	290	275,5	68,2	27,8
375	181	135	146	282	238	240	203,6	56,6	23,9
24h	75	70	78	70	87	75	75,8	6,3	2,5

Tab. 6: Blutzuckerkonzentration und ΔHbA_1 Werte von Probanden der Gruppe 2 während der Infusion mit 1,0 g - 1,5 g und 2,0 g Glukose/kg KG/h

t [min]	$\bar{x}$ BZ [mg/dl]	SD	SEM	$\bar{x}$ ΔHbA_1 [%]	SD	SEM
0	72,6	10,8	3,6	0	0	0
15	256,6	43,6	14,5	0,73	0,44	0,15
30	325,8	58,8	19,6	0,98	0,73	0,24
45	347,4	66,5	22,1	1,27	0,80	0,27
60	309,5	135,9	45,3	1,30	0,78	0,25
75	332,7	96,8	32,2	1,14	0,86	0,28
90	310,7	83,7	27,9	1,02	1,00	0,34
105	303,2	115,8	38,6	1,03	0,73	0,24
120	287,3	90,0	30,0	0,98	0,68	0,22
150	267,4	68,8	22,9	0,82	0,66	0,22
180	244,0	80,8	26,9	0,84	0,71	0,23
210	236,7	88,0	19,3	0,87	0,72	0,24
240	232,3	68,3	22,8	0,74	0,83	0,28
270	234,7	96,7	32,2	0,72	0,71	0,24
300	246,0	91,5	30,5	0,77	0,80	0,26
330	238,3	88,8	29,6	0,78	0,67	0,22
360	227,2	90,4	30,1	0,87	0,77	0,25
375	167,4	77,5	25,8	0,64	0,60	0,20
24h	69,1	24,1	8,0	0,22	0,28	0,09

Tab. 7: Hämoglobin A_1 Werte von Patienten der Gruppe 1 während der Glukoseinjektion

Patient:	S.S.	B.S.	V.K.	R.B.	H.K.	B.S.	E.M.	W.L.	K.K.	T.O.			
t[min]	HbA_1 [%]										$\bar{x}$	SD	SEM
0	9,5	11,7	6,8	9,6	9,2	6,2	14,2	4,5	7,0	4,6	8,33	3,1	0,98
3	9,5	12,4	7,5	9,9	9,1	7,1	14,9	6,3	7,7	6,3	9,07	2,8	0,88
5	9,7	12,2	7,6	9,9	9,2	7,1	14,8	5,7	6,6	5,8	8,86	2,9	0,91
8	9,7	11,7	7,8	9,7	9,7	6,9	14,4	5,0	6,6	6,3	8,78	2,8	0,88
10	9,8	12,2	7,6	10,1	9,2	7,1	14,6	4,8	7,2	6,6	8,92	2,9	0,91
15	10,8	12,0	7,7	9,9	9,3	6,9	14,5	5,4	6,9	4,8	8,82	3,0	0,95
20	9,9	12,0	7,4	9,6	9,6	6,7	14,6	5,5	6,5	6,3	8,81	2,9	0,91
30	9,7	11,9	7,5	9,3	9,1	6,5	14,5	5,4	6,5	5,1	8,55	3,0	0,95
60	9,8	11,9	7,5	9,6	9,3	6,6	14,3	5,2	7,0	4,9	8,61	3,0	0,95
180	9,8	12,3	7,2	9,3	9,2	6,4	13,7	4,7	7,1	4,6	8,43	3,0	0,95
24h	9,8	11,4	7,0	9,4	9,2	6,2	13,5	4,6	7,0	4,3	8,24	2,9	0,91

Tab. 8: △ Hämoglobin A_1 Werte von Patienten der Gruppe 1 während der Glukoseinjektion

Patient:	S.S.	B.S.	V.K.	R.B.	H.K.	B.S.	E.M.	W.L.	K.K.	T.O.			
t[min]	△ HbA_1 [%]										$\bar{x}$	SD	SEM
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	0	0,7	0,7	0,3	-0,1	0,9	0,7	1,8	0,7	1,7	0,74	0,62	0,2
5	0,2	0,5	0,8	0,3	0	0,9	0,6	1,2	-0,4	1,2	0,53	0,52	0,16
8	0,2	0	1,0	0,1	0,5	0,7	0,2	0,5	-0,4	1,7	0,45	0,59	0,19
10	0,3	0,5	0,8	0,5	0	0,9	0,4	0,3	0,2	2,0	0,59	0,56	0,17
15	1,3	0,3	0,9	0,3	0,1	0,7	0,3	0,9	-0,1	0,2	0,51	0,41	0,13
20	0,4	0,3	0,6	0	0,4	0,5	0,4	1,0	-0,5	1,7	0,48	0,58	0,18
30	0,2	0,2	0,7	-0,3	-0,1	0,3	0,3	0,9	-0,5	0,5	0,22	0,43	0,13
60	0,3	0,2	0,7	0	0,1	0,4	0,1	0,7	0	0,3	0,28	0,25	0,08
180	0,3	0,6	0,4	-0,3	0	0,2	-0,5	0,2	0,1	0	0,10	0,32	0,10
24h	0,3	-0,3	0,2	-0,2	0	0	-0,7	0.1	0	-0,3	0,03	0,30	0,09

Tab. 9:

Hämoglobin A_1 Werte und ΔHbA_1 Werte von Probanden der Gruppe 2 während der Infusion mit 1,5 g Glukose/kg KG

Patient:	P.S.	C.S.		P.S.	C.S.	
t [min]	HbA_1 [%]		$\bar{x}$	ΔHbA_1 [%]		$\bar{x}$
0	4,5	6,6	5,45	0	0	0
15	5,4	6,8	6,10	0,9	0,2	0,55
30	5,0	6,9	5,95	0,5	0,3	0,40
45	5,1	6,9	6,00	0,6	0,3	0,45
60	5,8	7,0	6,40	1,3	0,4	0,85
75	5,9	6,4	6,15	1,4	-0,2	0,80
90	5,5	6,5	6,00	1,0	-1,0	0
105	5,4	6,6	6,00	0,9	0	0,45
120	5,0	6,6	5,80	0,5	0	0,25
150	4,7	6,4	5,55	0,2	-0,2	0
180	4,6	6,7	6,65	0,1	0,1	0,10
210	5,3	6,6	5,95	0,8	0	0,40
240	4,7	6,9	5,80	0,2	0,3	0,25
270	5,0	6,3	5,65	0,5	-0,3	0,40
300	4,4	6,8	5,60	-0,1	0,2	0,15
330	4,5	6,7	5,60	0	0,1	0,05
360	4,8	6,6	5,70	0,3	0	0,15
375	4,7	6,6	5,65	0,2	0	0,10
24h	4,7	6,7	5,70	0,2	0,3	0,25

Tab 10: Hämoglobin A_1 Werte von Probanden der Gruppe 2 während der Infusion mit 2g Glukose/kg KG

Patient:	C.K.	U.K.	P.D.	I.H.	H.N.	C.K.			
t[min]	HbA_1[%]						$\bar{x}$	SD	SEM
0	6,6	5,7	7,0	6,3	6,2	6,2	6,3	0,44	0,12
15	7,9	6,2	8,3	6,7	7,4	6,6	7,2	0,82	0,33
30	7,1	6,7	9,0	7,0	8,6	7,2	7,6	0,95	0,39
45	8,3	6,6	9,2	7,4	9,0	7,3	7,9	1,02	0,42
60	7,9	6,4	9,4	7,2	8,9	7,5	7,9	1,10	0,45
75	8,3	6,4	8,6	6,7	9,0	7,2	7,7	1,10	0,43
90	8,6	6,3	8,6	7,4	8,8	7,1	7,9	1,08	0,44
105	7,5	6,3	8,7	7,3	8,8	7,1	7,6	0,96	0,39
120	7,7	6,3	8,1	7,8	8,6	7,2	7,6	0,79	0,32
150	7,2	6,6	8,0	7,4	8,4	7,1	7,4	0,65	0,26
180	7,0	6,8	8,0	7,4	8,6	7,2	7,5	0,67	0,27
210	7,0	6,3	7,9	7,9	8,6	7,1	7,4	0,82	0,33
240	6,6	6,1	7,7	8,5	8,2	7,2	7,3	0,92	0,37
270	7,1	6,0	7,8	7,9	8,2	7,1	7,3	0,79	0.32
300	6,8	6,1	7,7	8,1	8,4	7,5	7,4	0,85	0,34
330	7,0	6,2	7,8	7,8	8,2	7,5	7,4	0,71	0,29
360	6,9	6,0	8,4	7,7	8,4	7,4	7,4	0,92	0,37
375	7,0	5,8	7,6	8,0	7,9	7,0	7,2	0,81	0,33
24h	6,5	6,0	7,1	7,0	6,2	6,8	6,6	0,44	0,18

ab. 11: Δ Hämoglobin A_1 Werte von Probanden der Gruppe 2 während der Infusion mit 2 g Glukose/kg KG

Patient:	C.K.	U.K.	P.D.	I.H.	H.N.	C.K.			
t [min]	Δ HbA_1 [%]						$\bar{x}$	SD	SEM
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	1,3	0,5	1,3	0,4	1,2	0,4	0,85	0,45	0,16
30	o,4	1,0	2,0	0,7	2,4	1,0	1,25	0,77	0,27
45	1,7	0,9	2,2	1,1	2,8	1,1	1,63	0,74	0,26
60	1,3	0,7	2,4	0,9	2,7	1,3	1,55	0,81	0,29
75	1,7	0,7	1,6	0,4	2,8	1,0	1,36	0,86	0,35
90	2,0	0,6	1,6	1,1	2,6	0,9	1,46	0,74	0,30
105	0,9	0,6	1,7	1,0	2,6	0,9	1,29	0,76	0,31
120	1,1	0,6	1,1	1,5	2,4	1,0	1,28	0,61	0,25
150	0,6	0,9	1,0	1,1	2,2	0,9	1,11	0,55	0,22
180	0,4	1,1	1,0	1,1	2,4	1,0	1,16	0,65	0,26
210	0,4	0,6	0,9	1,6	2,4	0,9	1,13	0,74	0,30
240	0	0,4	0,7	2,2	2,0	1,0	1,05	0,88	0,36
270	0,5	0,3	0,8	1,6	2,0	0,9	1,01	0,65	0,26
300	0,2	0,4	0,7	1,8	2,2	1,3	1,10	0,80	0,32
330	0,4	0,5	0,8	1,5	2,0	1,3	1,08	0,62	0,25
360	0,3	0,3	1,4	1,4	2,4	1,2	1,16	0,79	0,32
375	0,4	0,1	0,6	1,7	1,7	0,8	0,88	0,67	0,27
24h	-0,1	0,3	0,1	0,7	0	0,6	0,26	0,32	0,13

Tab. 12:

HbA_1 [%] Gehalt der Erythrozyten von

Diabetikern			Stoffwechselgesunden		
12,1	11,5	10,3	5,3	6,5	6,2
11,0	10,8	12,4	6,1	5,7	7,0
11,1	9,5	9,8	4,3	6,2	6,2
10,5	9,5	11,7	5,5	6,1	5,8
7,8	9,6	9,2	6,5	6,8	5,9
9,0	14,2	10,1	6,7	4,9	6,3
10,5	8,8		6,4	5,5	

Nüchterrblutzucker-und HbA_1 Werte bei Diabetikern

BZ [mg/dl]	HbA1 [%]
124	9,5
240	11,7
141	7,8
226	9,6
104	9,2
133	9,0
360	14,2
145	10,1
127	10,5
115	8,8
$\bar{x}$ = 171,5	10,04
$s_x = \pm$ 80,4	$\pm$ 1,8

Nüchternblutzucker- und HbA_1 Werte bei stoffwechselgesunden Probanden

BZ [mg/dl]	HbA1 [%]
70	5,3
92	6,5
77	6,2
72	6,1
68	5,7
76	7,0
62	4,3
55	6,2
82	6,2
75	5,5
$\bar{x}$ = 72,9	5,5
$s_x = \pm$ 10,3	$\pm$ 1,9

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham,E.C., Huff,T.A., Cope,N.D., Wilson,J.B., Bransome, E.D., Huisman,T.H.J.,: Determination of glycosylated hemoglobins (HbA_{1c}) with a new micro-column procedure, suitability of the technique for assessing the clinical management of diabetes mellitus. Diabetes 27: 931 - 937 (1978)
2. Abraham,E.C., Stallings,M., Cameron,B.F., Huisman,T.H.J., Minor Hemoglobins in Sickle Cell Heterocygotes with and without Diabetes. Biochem. Biophys. Acta 625; 109 - 117 (1980)
3. Allen,D.W., Schroeder,W.A., Balog,J.,: Observation of the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin: A Study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. J.Am.Chem.Soc. 80: 1628-1634 (1958)
4. Bantig,F.G., Best,C.H.,: The internal secretion of the pancreas. J.Lab.clin.Med. 7:251 (1922)
5. Begemann,H.,: Praktische Hämatologie. Thieme Verlag (1982)
6. Bisse,E., Berger,W., Flückiger,R., Quantitation of glycosylated hemoglobin. Elimination of labile glycohaemoglobin during sample hemolysis at pH 5. Diabetes 31, 630 - 633 (1982)
7. Boden,G., Master,R.W., Gorden,S.S., Shuman,C.R., Owen,O.E., Monitoring Metabolic Control in Diabetic Outpatients with Glycosylated Hemoglobin, Ann. Int. Med. 92: 357-360, (1980)

8.Bookchin,R.M., Gallop,P.M., Structure of hemoglobin A_{1c}: Nature of the N-terminal beta chain blocking group. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 32 (1): 86-93 (1968)

9. Bunn,H.F., Nonenzymatic Glycosylation of Protein : Relevance to Diabetes. Am.J.Med. 70:325-330 (1981)

10. Bunn,H.F.,: Evaluation of Glycosylated Hemoglobin in Diabetic Patients. Diabetes 30:613-617 (1981)

11. Bunn,H,F., Haney,D.N., Gabbay,K.H., Gallop,P.M.,: Further identification of the nature and linkage of carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. Biochem. and Biophys. Res . Commun. 67: 103-109 (1975)

12. Bunn,H.F., Haney,D.N., Kamin,S., Gabbay,K.H., Gallop,P.M., The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}, slow glycosylation of hemoglobin in vivo. J.Clin.Invest. 57: 1652-1659 (1976)

13. Bunn,H.F., Shapiro,R., McManus,M., Garrick,L., McDonald, M.J., Gallop,P.M., Gabbay,K.H., Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation J.Biol.Chem. 254 (10): 3892-3898 (1979)

14. Cole,R.A., Soeldner,J,S., Dunn,P.J., Bunn,H.F.,: A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobins using high pressure liquid chromatography Metabolism 27 (3): 298-301 (1978)

15. Compagnucci,P., Cartechini,M.G., Bolli,G., DeFeo,P., Santeusanio,F., Brunetti,P.,: The importance of determining irreversibly glycosylated hemoglobin in diabetics. Diabetes 30: 607-612 (1981)

16. Davis,J.E., McDonald;J.M:, Jaret.,L.,: A high-performance liquid chromatography method for hemoglobin A_{1c}. Diabetes 17: 102-107 (1978)

17. Ditzel,J., Kjaergaard,J.,: Hemoglobin A_1 concentration after initial insulin treatment for newly discovered diabetes. Brit. Med. J. 1: 741-742 (1978)

18. Dolhofer,R., Stadele,A., Wieland,O.H.,: Clinical and biochemical studies on the significance and formations of hemoglobins A_{1c} and A_{1a+b} in diabetes mellitus. Klin. Wschr. 55: 945-954 (1977)

19. Elseweidy,M.M., Stallings,M., Abraham,E.C.,: Changes in glycosylated hemoglobins with red cell aging in normal and diabetic subjects and in newborn infants of normal and diabetic mothers. J. Lab. Med. 102.(4) 628-636 (1983)

20. Fitzgibbons,J.F., Koler,R.D., Jones,R.T., Red cell age-related changes of hemoglobin A_{1a+b} and A_c in normal and diabetic subjects. J. Clin. Invest. 58: 820 - 824 (1976)

21. Flückiger,R., Winterhalter;K.H., In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}.FEBS Letters 71 (2): 356-360 (1976)

22. Fraser,D.M., Smith,A.F., Gray,R.S., Borsey,D.Q., Sinclair, M.E., Clarke,B.F., Duncan,L.J.P.,: Glycosylated hemoglobin concentrations in newly diagnosed diabetics before and during treatement. Brit. Med. J. 1:979-981 (1979)

23. Gabbay,K.H., Hasty,K., Breslow,J., Ellison,R.C., Bunn,H.F., Gallop,P.M.,:Glycosylated hemoglobins and long term blood glucose control in diabetes mellitus. J. Clin. End. & Metab. 44 (5): 859-864 (1977)

24. Gabbay,K.H., Sosenko,J.M., Banuchi,G.A., Minisohn,J.M., Flückiger,R.,: Glycosylated hemoglobins: Increased glycosylation of hemoglobin A in diabetic patients. Diabetes 28: 337-340 (1979)

25. Gain,T., Henderkott,U., Bottermann,P.,: Hämoglobin A_1 - Bestimmung beim oralen Glukosetoleranztest. Akt. Endokrin 2 132-135 (1981)

26. Goebel,F.D., Fuessl,H., Kolmar,C., Neumaier,E.,: Short-term Changes of Glycosylated Haemoglobins During Glucose Administration in Healthy and Diabetic Subjects. Res. Exp. Med. 179(2) 133-140 (1981)

27. Goebel,F.D., Fuessl,H.S.,: Changes in glycosylated haemoglobin after oral glucose load. Brit. Med. J. 284 598-599 (1982)

28. Goebel,F.D., Fuessl,H.S.,: Ausmaß und Bedeutung der Aldimin Fraktion der glycosylierten Hämoglobine. Lab. med. 8: 40-42 (1984)

29. Goldstein,D.E.: Is glycosylated hemoglobin clinically useful. N. Engl. J. Med. 310(6) 384-385 (1984)

30. Gonen,B., Rubenstein,A.H.,: Hemoglobin A_1 and diabetes mellitus. Diabetologia 15: 1-8 (1978)

31. Haney,D.N., Bunn,H.F.,: Glycosylation of hemoglobin in vitro: Affinity labelling of hemoglobin by glucose-6-phosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. 73: 3534-3538 (1976)

32. Holmquist,W.R., Schroeder,W.A.,: A new N-teminal blocking group involving a schiff base in hemoglobin A_{1c}. Biochemistry 5: 2489-2503 (1966)

33. Huisman,T.H.J., Dozy,A.M.,: Studies on the heterogeneity of hemoglobin. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. J.Lab.Clin.Med. 60: 303-318 (1962)

34. Javanovic,L., Peterson,C.M.,: The clinical utility of glycosylated hemoglobin. Am. J. Med. 70: 331-338 (1981)

35. Javid,J., Pettis,P.K., Koenig,R.J., Cerami,A.,: Immunologic characterization and quantification of hemoglobin A_{1c}.Br. J. Haematol. 38: 329-337 (1978)

36. Jones,R.T., Ph.D. Thesis, California Institute of Technology, Pasadena, California (1961)

37. Jones,M.B., Kofer,R.D., Jones,R.,: Microcolumn method for the determination of hemoglobin minor fractions A_{1a+b} and A_{1c}. Hemoglobin 2: 53 (1978)

38. Koenig,R.J., Blobstein,S.H., Cerami,A.,: Sructure of the carbohydrate of hemoglobin A_{1c}. J. Biol. Chem. 252: 2992-2997 (1977)

39. Koenig,R.J., Cerami,A.,: Synthesis of hemoglobin A_{1c} in normal and diabetic mice: Potential model of basement membrane thickening. Proc. Nat. Acad. Sci. 3687-3691 (1975)

40. Koenig,R.J., Peterson,C.M., Jones,R.L., Saudek,C., Lehrman,M., Cerami,A.,: Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 295: 417-420 (1976)

41. Koenig,R.J., Peterson,C.M., Kilo,C., Cerami,A., Williamson, J.R.,: Hemoglobin A_{1c} as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. Diabetes 25 (3) 230-232 (1976)

42. Kunkel,H.G., Wallenius,G., New hemoglobin in normal adult blood. Science 122:285 (1955)

43. Kynoch,R.A.M., Lehmann,H., Rapid estimation (2 1/2h) of glycosylated hemoglobin for routine purposes. Lancet 2: 16-22 (1977)

44. Maquart,F.X., Poynard,J.P., Borel,J.P., Leutenegger,M., Evolution of Haemoglobin A_{1c} after Oral Glucose. (Letter) Lancet 19: 431-432 (1978)

45. McDonald,M., Shapiro,R., Bleichman,M., Soloway,J., Bunn, H.F.,: Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. J. Biol. Chem. 253: 2327-2332 (1978)

46. Menard,L., Dempsey,M.E., Blankenstein,L.A., Aleyassine,H., Wacks,M., Soeldner,J.S.,: Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A_1 by agar gel electrophoresis. Clin Chem. 26 (11): 1598-1602 (1980)

47. Moore,E., Stroupe,S., Blecka,L.,: Automated spectrophotometric assay for glycosylated hemoglobin. Diabetes 29: 70A Abstract (1980)

48. Morrison,M., Cook,J.l.,: Chromatographic fractionation of normal adult oxyhemoglobin. Science 122:920 (1955)

49. Nathan,D.M., Avezzano,E.S., Palmer,J.L.,: A rapid chemical means for removing labile glycohemoglobin. Diabetes 30: 700-701 (1981)

50. Nathan,D.M., Singer,D.E., Hurxthal,K., Goodson,J.D.,: The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. N. Engl. J. Med. 310(6) 341-346 (1984)

51. Nathan,D.M., Dunn,B.S., Francis,T.B.,: Two commercial methods evaluated for eliminating the labile fraction

from the assay for glycated hemoglobin (glycohemoglobin) Clin. Chem. 30/1 109-110 (1984)

52. Niederau,C.M., Potthof,S., Gries,F.A., Reinauer,H.,: Zum Aussagewert von glycosidierten Hämoglobinen bei Diabetes mellitus und bei Gravidität. Lab. med. 4:9 (1980)
53. Niederau,C.M., Reinauer,H.,: Analyseverfahren für glykosidierte Hämoglobine ein Methodenvergleich.
54. Panzer,S., Kronik,G., Lechner,K., Bettelheim,P., Neumann,E., Dudczak,R., Glycosylated hemoglobin: an index of red cell survival. Blood 59:1348-1350 (1982)
55. Panzer,W., Graninger,W., Kronik,G., bettelheim,P., Lechner,K.,: Glycosylated hemoglobin as a long-term parameter in appraising the severity of hemolytic disease. Klin. Wochenschr. 61: 839-843 (1983)
56. Paulsen,E.P., Koury,M., HemoglobinA_{1c} levels in insulin-dependent and -independent diabetes mellitus. Diabetes 25 (2): 890-896 (1976)
57. Rahbar,s., An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin. Chim. Acta 22: 296-298 (1968)
58. Rahbar,S., Blumenfeld,O., Ranney,H.M., Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 36.5:838-834 (1969)
59. Raskin,P., Pietri,A.O., Unger,R., Shannon,W.A., The effect of diabetic control on the width of skeletal-muscle capillary basement membrane in patients with Typ I diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 309 1546-1550 (1983)

60. Rosenthal,M.A., The effect of temperature on the Fast Hemoglobin Test System. Hemoglobin 3: 215-217 (1979)

61. Sachse,G., Koch,U., Laube,H., Federlin,K., Ist HbA_{1a-c} wirklich ein aussagekräftiger Langzeitparameter zur Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellage? Einfluß von kurzfristigen Blutzuckerschwankungen auf die HbA_{1a-c} Konzentration. Akt. Endokrin. 2 136-139 (1981)

62. Schauder,P., Hintz,W., Bestimmung glycosylierter Hämoglobine mit dem "Fast Hemoglobin test System". DMW 106:262-266 (1981)

63. Shapiro,R., McManus,M.J., Zalut,C., Bunn,H.F., Sites of non enzymatic glycosylation of human hemoglobin A. J. Biol. Chem. 255 (7): 3120-3127 (1980)

64. Sosenko,J.M., Flückiger,R., Platt,O.S., Gabbay,K.H., Glycosylation of variant hemoglobins in normal and diabetic subjects. Diabetes Care 3(5):590-593 (1980)

65. Sosenko,J.M., Miettinen,O.S., Williamson,J.R., Gabbay,K.H., Muscle cappilary basement-membrane thickness and long - term glycemia in typ I diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 311: 694-698 (1984)

66. Spicer,K.M., Allen,R.C., Hallett,D., Buse,M.G., Synthesis of hemoglobin A_{1c} and related minor hemoglobins by erythrocytes. J.Clin.Invest. 64: 40-48 (1979)

67. Sprandel,U., Hubbard,A.R., Chalmers,R.A., Membrane transport in resealed hemoglobin containing human erythrocyte "ghosts" prepared by a dialysis procedure. Biochem. Biophys. Res. Comm. 91:79-85 (1979)

68. Stevens,V.J., Vlassar,H., Abati,A., Ceramy,A., Non-encymatic glycosylation of hemoglobin. J. Biol. Chem. 252: 2998-3002 (1977)

69. Stickland,M.H., Perkins,C.M., Wales,J.K.,: The measurement of hemoglobin A_{1c} by isoelectric focusing in diabetic patients. Diabetologia 22,315-317 (1982)

70. Svendsen,P.Aa., Christansen,J.S., Soegaard,U., Welinder B.S., Nerup,J., Rapid changes in chromatographically determined haemoglobin A_{1c} induced by short-term changes in glucose concentration. Diabetologia 19:130-136 (1980)

71. Trivelli,L.A., Ranney, H.M., Lai,H., Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 284 (7): 353-357 (1971)

72. Welch,S.G., Boucher,B.J., A rapid micro-scale method for the measurement of hemoglobin $A_{1(a+b+c)}$. Diabetologia 14: 209-211 (1978)

Ich danke Herrn Prof. Dr. N. Zöllner, daß ich die Untersuchungen für meine Arbeit an seiner Klinik vornehmen konnte.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F.D. Goebel für die Einführung in die wissenschaftliche Methodik und für die Betreuung meiner Arbeit.

LEBENSLAUF

12. März 1953	geboren in Berlin als Sohn des Dr. med Dietrich Kolmar und seiner Ehefrau Katharina geb. Dlugi
1959 - 1965	Besuch der Grundschule in Berlin-Dahlem
1965-18.1.1973	Besuch des Arndt Gymnasiums in Berlin-Dahlem mit Abschluß Abitur
Oktober 1973	Immatrikulation an der TU Berlin im Fach Lebensmittelchemie
April 1976	Diplomvorprüfung in organischer und anorganischer Chemie
Oktober 1976	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der FU Berlin
Oktober 1979	Weiterstudium an der LMU München
Oktober 1982	Dritter Abschnitt des Staatsexamens
26.10.1982	Approbation
seit März 1983	Assistenzarzt am Krankenhaus Moabit Berlin auf der Hämatologischen Abteilung
seit März 1984	Assistenzarzt am Krankenhaus München Schwabing auf der Gastroenterologischen Abteilung
Mai 1984	Umzug der Abteilung in das Krankenhaus München Bogenhausen